THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

PAR

Claude ZARROUK

INGÉNIEUR E. N. S. A. N.
LICENCIÉ ÈS SCIENCES

Première thèse

Contribution à l'étude d'une cyanophycée Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

soutenues le 6 décembre 1966 devant la Commission d'Examen

MM. les professeurs P. LAFFITTE..... *Président*
A. MOYSE..... } *Examinateurs*
J. C. BALACEANU.. }

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544317_0046

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

PAR

Claude ZARROUK

INGÉNIEUR E. N. S. A. N.
LICENCIÉ ÈS SCIENCES

Première thèse

Contribution à l'étude d'une cyanophycée Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

soutenues le 6 décembre 1966 devant la Commission d'Examen

MM. les professeurs P. LAFFITTE..... *Président*
A. MOYSE..... } *Examinateurs*
J. C. BALACEANU.. }

UNIV.
LEIDEN

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

PROFESSEURS

DOYEN M. ZAMANSKY

PRENANT	T	Anatomie et histologie comparée
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
WYART	T	Minéralogie et cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
AUGER	T	Physique quantique et relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique E.N.S.
CARTAN	T	Mathématiques E.N.S.
LAFFITTE	T	Chimie générale
N ...	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du globe
Mlle COUSIN	T	Biologie animale SPCN
CHRETIEN	T	Chimie minérale
BOCQUET	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique E.N.S.
EPHRUSSI	T	Génétique
GAUTHERET	T	Biologie végétale CPEM
LUCAS R.		Recherches physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
MORAND	T	Physique enseignement
SOLEILLET	T	Physique CPEM
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DRACH	T	Zoologie
QUENEY	T	Météorologie et dynamique de l'atmosphère
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie végétale SPCN
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du globe
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Géologie
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théorie physique
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et cristallographie
J.P. MATHIEU	T	Physique optique
COUTEAUX	T	Cytologie
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématiques
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (technique aéronautique)
BRELOT	T	Analyse supérieure
NORMANT	T	Synthèse organique
BENARD	T	Chimie appliquée
DUGUE	T	Statistique mathématique
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie algébrique
FRANCON	T	Physique SPCN
GLANGEAUD	T	Géographie physique, géologie dynamique
DODEMENT	T	Mathématiques MGP
MAGNAN		Physique électricité
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire
Mlle FOURCROY		Biologie végétale SPCN
Mme CHOQUET BRUHAT		Mécanique analytique et mécanique céleste
Mlle VEIL	T	Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérim.
CABANNES	T	Mécanique générale
CAIRE	T	Géographie physique et géologie dynamique
COMOLET		Mécanique des fluides
PISOT		
ROCH		
SCHATZMANN		
TERMIER		
ZAMANSKY		
LENNUIER		
ROUTHIER		
Mme TONNELAT		
DIXMIER		
SOUCHAY		
AIGRAIN		
BRUSSET		
LEVY		
Mme CHAIX		
Mme HUREL PY		
PANNETIER		
BRUN		
Mme DUBREIL		
Mme LELONG		
BELLAIR		
COTTE		
DUBOIS J.E.		
LAMOTTE		
OLMER		
GAUTHIER		
BARCHEWITZ		
BROSSEL		
BUSER		
CAMUS		
CURIEN		
POSSOMPES		
PULLMANN		
TEILLAC		
VILLE		
WILLEMART		
FREYMANN		
ROLLET		
Mlle JOSIEN		
CHEVALLEY		
GERMAIN		
LUCAS G.		
ALLARD		
BERTHELOT		
BRICARD		
Mme ALBE-FESSARD		
M. JULIA		
MAGAT		
Mlle QUINTIN		
MONOD		
DE POSSEL		
CHARLOT		
CHATELET		
MATTLER		
BOUISSIERES		
Mme COUTURE		
FRANC		
SCHNELL		
STOLKOWSKI		
ACHER		
BAUDOIN		
BEAUMONT		
BLAMONT		
BOUREAU		
CURIE D.		
DURAND DELGA		
HELLER		
TORTRAT		
CAILLEUX		
DELLOUE		
HOUILLON		
OLIVIER		
SAMUEL		
THIRY		
ABELES		
AMAT		
AUBOIN		
Mme BENOIT-GUEUTAL		
BOUGIS		
T	Technique mathématique de la physique
---	---
T	Géologie
T	Astrophysique
T	Géologie générale
T	Mathématiques générales
T	Physique M.G.P.
T	Géologie appliquée
T	Physique théorique
T	Mathématiques M.P.C.
T	Chimie générale
T	Electrotechnique
T	Chimie systématique
T	Physique théorique des hautes énergies
T	Chimie biologique
T	Biologie végétale CPEM
T	Chimie générale I
T	Mécanique des fluides I
T	Mathématiques (Agrégation)
T	Mathématiques II E.N.S.
T	Géologie S.P.C.N.
T	Physique électricité
T	Chimie organique physique
T	Zoologie E.N.S.
T	Energétique générale
T	Mécanique appliquée
T	Chimie physique
T	Physique atomique
T	Physiologie comparée
T	Physiologie végétale
T	Minéralogie et cristallographie
T	Zoologie
T	Chimie quantique
T	Physique nucléaire et radio-activité
T	Econométrie
T	Chimie CPEM
T	Recherches physiques
T	Chimie minérale
T	Chimie SPCN
T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
T	Mécanique théorique des fluides
T	Géologie
T	Chimie physique
T	Physique des particules fondamentales
T	Météorologie
T	Psycho-physiologie
T	Etude des molécules naturelles complexes
T	Physico-chimie des rayonnements
T	Electrochimie
T	Chimie du métabolisme
T	Analyse numérique
T	Chimie analytique
T	Chimie CPEM
T	Physique SPCN
T	Radiochimie
T	Thermodynamique et mécanique physique
T	Biologie animale CPEM
T	Botanique tropicale
T	Physiologie générale
T	Chimie biologique
T	Biologie animale CPEM
	Biologie animale SPCN
	Géophysique ionosphère
T	Botanique
	Physique MGP
T	Géologie
T	Physiologie végétale
T	Calcul des probabilités
T	Géologie SPCN
T	Physique de l'exosphère
	Biologie animale CPEM
	Anthropologie
T	Mathématiques (ENS Jeunes filles)
T	Mécanique céleste
T	Physique SPCN
T	Thermodynamique
T	Géologie
T	Physique nucléaire et radio-activité
	Biologie végétale marine Villefranche s/Mer
RIGAUDY	T	Chimie SPCN
COLLONGUES		Chimie CPEM
DUBERT		Biochimie
NOZIERES		Physique générale
CADIOT		Chimie organique
IVANOFF		Océanographie physique
FRANCOIS		Zoologie
TALBOT		Génie chimique
Mme NOUGAREDE		Botanique
BRUHAT	T	Mathématique MPC
FOURNET		Electricité générale
DEHEUVELS	T	Mathématiques propédeutique
FURON	T	Géologie SPCN
Mme GANS	T	Génétique
GENEVES		Biologie végétale CPEM
HUPE	T	Pétrographie
HOLLANDE	T	Biologie générale
LIONS	T	Analyse numérique
MAITTE	T	Chimie organique
NICOLAS		Géologie appliquée
PANIGEL		Biologie générale
RAVIER	T	Pétrographie
MOREL F.	T	Physiologie comparée
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides
ROUBINE		Electronique E.S.E.
SILBER	T	Chimie CPEM
UEBERSFELD	T	Electronique
YVON	T	Théories physiques
HERVE	T	Mathématiques
Mme PECKER-WIMEL	T	Astrophysique
BALKANSKI		Physique M.P.C.
LE CORRE	T	Electricité
NATAF	T	Physique nucléaire et radio-activité
ECHALIER		Biologie animale CPEM
BARRAUD	T	Physique CPEM
DARS		Géologie structurale et appliquée
CAMEFORT	T	Botanique (agrégation)
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle
SIGWALT	T	Chimie SPCN
BLAQUIERE		Electronique
BARUCH		Physique propédeutique
ARNOUS	T	Physique théorique
SLONIMSKI		Génétique
MALLIAVIN	T	Mathématiques propédeutiques
GAUDEMAR		Chimie propédeutique
BROUSSE	T	Mécanique théorique
ROSCH	T	Astronomie
GUY	T	Physique expérimentale
LAZARD		Mathématiques MPC
MOREL P.		Physique MPC
ARSAC		Programmation
LEFEBVRE		Chimie MPC
BOK		Physique propédeutique
CHAPEVILLE		Biochimie
BENOIT		Physique CPEM
RIO		Chimie CPEM
JAUZEIN		Géologie ENS
PREVOST G.		Biologie végétale CPEM
FAVARD P.		Biologie animale CPEM
Mme CHARNIAUX-COTTON		Evolution des êtres organisés
Mlle FICINI		Chimie CPEM
LEQUEUX		Astronomie
COHEN TANNOUDJI		Physique atomique
TAVERNIER		Physique CPEM
DURAND Michel		Biologie animale SPCN
PASCAUD		Physiologie
Mme PETIT		Biologie animale CPEM
CAGNAC		Physique agrégation
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire
KRASNER	T	Mathématiques
BENZECRI	T	Statistiques
VINH MAU		Physique M.G.P.
DUQUESNES		Physique CPEM
SCHUTZENBERGER		Programmation
TREMILLON		Chimie MPC
FAYARD		Chimie MPC
BUVET		Chimie CPEM
AUTHIER		Physique MPC
PICINBONO	T	Physique CPEM
BONNEFILLE		Electrotechnique
Mme PUISEUX DAO		Biologie végétale

LE SECRETAIRE GENERAL : R. POULLAIN

FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

PROFESSEURS

MANGENOT G.	T	Biologie végétale
JACQUINOT P.	T	Optique
GUINIER A.	T	Electricité et physique des solides
GRIVET P.	T	Electronique
BLANC-LAPIERRE A.	T	Accélérateur linéaire
L'HERITIER P.	T	Génétique des virus
LEMEE G.	T	Ecologie végétale
MOYSE A.	T	Physiologie végétale
DODE M.	T	Chimie thermodynamique
DENY J.	T	Mathématiques
RIVIERE A.	T	Géologie générale et sédimentologie
MICHEL A.	T	Chimie minérale
MAY R.	T	Anatomie comparée
DELANGE H.	T	Mathématiques
CHAPELLE J.	T	Physique expérimentale
LACOMBE P.	T	Métallurgie
BENOIT P.	T	Physiologie générale
GUINOCHET J.	T	Biologie végétale SPCN
NERON A.	T	Mathématiques
NOZERAN R.	T	Botanique approfondie
CASTAING R.	T	Thermodynamique
ELLENBERGER F.	T	Géologie structurale
LEDERER E.	T	Chimie biologique
RIZET J.	T	Génétique
LENDER T.	T	Biologie animale SPCN
POITOU G.	T	Mathématiques
FREON P.	T	Chimie organique
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique
BRUNN Jan		
JEAN M.		
BERGERARD J.		
ROGER J.		
LEFORT M.		
LAGARRIGUE A.		
JULIEN J.		
ARNULF A.		
ROUAULT M.		
MARECHAL A.		
MAZET R.		
DAVID Serge		
GUERIN H.		
LESIEUR L.		
KOURGANOFF		
ARNOULT P.		
KAHANE J.P.		
BROCHARD J.		
Mme ROIZEN		
BERTEIN F.		
MALGRANGE B.		
CORABOEUF E.		
FRIEDEL J.		
CHEVAUGEON J.		
MEYER P.		
LEHMANN P.		
CHABBAL R.		
DELCROIX J.M.		
CERF J.		
D'ESPAGNAT B.		
T	Géologie historique
---	---
T	Physique nucléaire
T	Zoologie
T	Paléontologie
T	Chimie nucléaire
T	Physique des hautes énergies
T	Chimie structurale organique
T	Optique
T	Diffraction électronique
T	Optique théorique et appliquée
T	Mécanique générale
T	Chimie agrégation
T	Chimie des gaz et des combustibles
T	Mathématiques MPC et algèbre
T	Astronomie
T	Physique électronique
T	Mathématiques
T	Physique propédeutique
T	Physique C.P.E.M.
T	Electronique
T	Mathématiques
T	Physiologie animale
T	Physique des solides
T	Cryptogamie
T	Physique théorique et atomique
T	Accélérateur linéaire
T	Physique propédeutique
T	Physique des plasmas
T	Mathématiques
T	Physique théorique
SCHAEFFER P.	T	Microbiologie
DE GENNES P.	T	Physique des solides
Mme MARTY N.		Physique propédeutique
GOURDIN M.		Physique théorique
PEREZ-Y-JORBA		Physique propédeutique
GORENFLOT E.		Biologie végétale SPCN
RIOU M.		Physique nucléaire
BROUSSE R.		Géologie SPCN
LIORET C.		Physiologie végétale
CLAUSER H.		Chimie biologique
JANCOVICI B.		Physique atomique
LURCAT J.		Physique propédeutique
LE BERRE J.		Entomologie
LAVOREL J.		Biophysique
PERIO P.		Physique propédeutique
FETIZON M.		Stéréochimie
CHEMLA M.		Chimie des isotopes
MAZIERES C.		Chimie SPCN
VILKAS M.		Chimie CPEM
BLANDIN A.		Physique des solides
BRUN G.		Génétique
MERCOUROFF		Physique agrégation
ANDRE J.		Microscopie électronique
CHEVALLIER F.		Physiologie animale
Mlle MARCOU		Biologie cellulaire CPEM
BOURDU R.		Physiologie végétale
BERKALOFF A.		Biologie animale CPEM
Mlle LEFORT M.		Biologie cellulaire CPEM
Mme LAMBERT		Physique CPEM
BIZOT J.C.		Physique MPC
GUIRAUD J.P.		Mécanique
LABOUESSE B.		Chimie SPCN

La présente recherche a été poursuivie dans les laboratoires de l'Institut Français du Pétrole que je tiens à remercier en la personne de son Président Directeur-Général Monsieur R. NAVARRE, pour l'appui matériel qui m'a été accordé.

J'assure de ma profonde gratitude M. le Professeur P. LAFFITTE qui a bien voulu présider ce Jury ainsi que M. le Professeur A. MOYSE et Monsieur J.C. BALACEANU qui ont accepté de faire partie de la commission d'examen.

Je prie tout particulièrement M. J.C. BALACEANU, Directeur de l'Institut Français du Pétrole et Mademoiselle G. CLEMENT, d'accepter l'expression de ma vive reconnaissance pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et la part si active qu'ils ont prise à son élaboration.

Je tiens à adresser également mes sincères remerciements à Monsieur M. REBELLER du Laboratoire des Algues, de même qu'à toutes les autres personnes des différents services pour leur aide technique, leurs conseils et leur sympathie qui m'ont été des plus précieux.

S O M M A I R E

Pages

INTRODUCTION 1

C h a p i t r e I

L'ALGUE ET SA CULTURE

I - DESCRIPTION SOMMAIRE DE L'ALGUE 3

II - MILIEU DE CULTURE - ENTRETIEN DE LA SOUCHE 3

A - Les conditions naturelles 3
B - Composition du milieu synthétique 4
C - Entretien et utilisation de la souche 5

C h a p i t r e II

ETUDE EXPERIMENTALE. RESULTATS

I - ETUDE DE LA CROISSANCE DES CULTURES 6

A - Méthodes de mesure de la croissance 6
B - Appareillage et conditions d'étude de la croissance des algues 7
C - Influence des facteurs physiques sur la croissance de l'algue 9
D - Influence des facteurs chimiques sur la croissance 14

1) Rappel des conditions standards d'étude de la nutrition des algues 14
2) Salinité du milieu de culture 14
3) Nutrition carbonée et pH 16
4) Nutrition azotée 18
5) Influence de K, Na et du rapport K/Na 22
6) Influence de Cl et des autres halogènes 27
7) Influence des autres éléments du milieu 28

II - ETUDE DE LA PHOTOSYNTHESE CHEZ SPIRULINA MAXIMA 33

A - Vérification du quotient photosynthétique en milieu basique 33
B - Mesure du rendement quantique par une méthode calorimétrique 35
C - Influence de divers facteurs sur la photosynthèse 39

1) Etude des conditions expérimentales 39
2) Influence du pH et de la source de carbone sur la photosynthèse 43

Pages

Chapitre III

INTERPRETATION DES RESULTATS - DISCUSSION

I - INFLUENCE DES FACTEURS PHYSIQUES SUR LA CROISSANCE DES CULTURES .. 50

A - La température 50
B - L'éclairement 51

II - INFLUENCE DES PARAMETRES CHIMIQUES SUR LA CROISSANCE DES CULTURES 52

A - La salinité du milieu 52
B - La nutrition carbonée et le pH 53
C - La nutrition azotée 56
D - Influence de K, Na et du rapport K/Na 59
E - Influence du chlore et d'autres halogènes 61
F - Etude des autres éléments du milieu de culture 62

III - ETUDE DE LA PHOTOSYNTHESE CHEZ SPIRULINA 64

A - Mesure du quotient photosynthétique 64
B - Mesure du rendement quantique..... 65
C - Influence de la température sur la photosynthèse 65
D - Influence du pH et de la source carbonée sur la photosynthèse Rôle des ions HCO_3^- et CO_3^{--} 66

CONCLUSION 75

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 77

INTRODUCTION

La nécessité de rechercher des solutions au problème de la sous alimentation et de la malnutrition de nombreuses populations du globe devient de plus en plus impérieuse. L'existence conjointe dans certaines régions de l'énergie solaire et de gisements de gaz naturel peut être mise à profit pour obtenir économiquement à partir du CO_2 , par photosynthèse accélérée, des produits utilisables comme aliments . Il importe alors de sélectionner des espèces végétales présentant des propriétés nutritives intéressantes et des vitesses de croissance élevées. Des algues microscopiques répondent à ces conditions ; mais les plus étudiées dans ce sens jusqu'à présent, les algues du type chlorelle, présentent des difficultés de culture, de récolte (nécessité d'une ultra centrifugation) et de conservation.

Or, en 1959 M.Y. BRANDILY (1) signalait l'existence au nord de la République du Tchad d'une population noire se nourrissant d'algues depuis les temps les plus anciens et utilisant encore actuellement pour la récolte et la conservation du phytoplancton les méthodes les plus primitives ; ces algues qui s'accumulent à la surface des mares sont recueillies dans de simples paniers de vannerie, séchées sur le sable au soleil et conservées facilement sous la forme d'une galette, "la Dié". Les difficultés technologiques rencontrées avec les cultures de chlorelles pouvaient donc être surmontées. Ainsi à la demande de l'Institut Français du Pétrole, une mission de M.Y. et M. BRANDILY, dans la région de Fort-Lamy, fut-elle organisée pour rapporter des échantillons de ces algues. Identifié par M. LEFEVRE, Directeur du Laboratoire d'Hydrobiologie du C.N.R.S., le phytoplancton prélevé à Andjaram est presque uniquement constitué par Spirulina maxima (SETCH. et GARDNER) GEITLER (2). C'est une cyanophycée pluricellulaire appartenant à l'Ordre des Nostocales et à la Famille des Oscillatoriacées (3). La principale caractéristique de Spirulina maxima est de vivre dans un milieu contenant de très fortes teneurs de bicarbonate et de carbonate de Na, d'où la salinité et l'alcalinité très élevées de ce milieu. On ne dispose jusqu'à présent que de fort peu de renseignements au sujet de cette algue bien que plusieurs auteurs aient remarqué depuis longtemps l'existence d'une flore lacustre importante dans le centre de l'Afrique, et en particulier d'algues bleues du genre

Spirulina. De nombreux rapports de mission de 1929 à 1955 (4 à 10) signalent la présence, dans plusieurs lacs africains, d'Arthrospira platensis (NORDST) GOMONT ; cette cyanophycée, appelée par la suite Spirulina platensis (NORDST) GEITLER (5 à 7) a été identifiée depuis bien longtemps (11, 12). En 1965, dans une étude détaillée des eaux des lacs d'Afrique J.F. et I.B. TALLING (13) soulignent l'abondance exclusive de Spirulina platensis dans les eaux très riches en carbonate de Na et de pH voisin de 10. Tout récemment encore (14) un rapport d'expédition indique en particulier que la "Dié" vendue sur les marchés de Fort-Lamy est constituée essentiellement de cette même algue, Spirulina platensis, prélevée dans la région d'Ounianga Kébir, et précise que jusqu'à présent cette cyanophycée n'a jamais été étudiée.

Quoi qu'il en soit, l'algue qui fait l'objet de cette thèse est un aliment de choix pour les populations indigènes puisqu'elle contient environ 10 % d'azote dans sa matière sèche, soit près de 63 % de protéines. C'est la raison pour laquelle l'I.F.P. étudie le développement sur une grande échelle de la culture de cette algue en milieu synthétique ; et c'est dans le cadre de cette étude que cette thèse a été effectuée.

L'objet des recherches entreprises dans ce travail est l'étude au laboratoire de la croissance de Spirulina maxima afin d'établir en particulier les conditions optimales de culture de cette algue ; et ce, en mettant en oeuvre de façon systématique les méthodes expérimentales de l'étude cinétique des réactions chimiques et plus spécialement des réactions photochimiques, méthodes couramment pratiquées à l'I.F.P.

Dans une première partie on traitera de l'influence des différents paramètres physiques et chimiques sur le processus global de la croissance de l'algue : une fois déterminée l'influence de l'intensité lumineuse, celle de la température et des facteurs nutritifs sera étudiée dans des conditions d'éclairement limitant comme c'est probablement le cas pour les épaisses fleurs d'eau constituées par les spirulines dans les mares du Tchad.

La seconde partie vise principalement à apporter une contribution à l'étude de la photosynthèse particulièrement intéressante dans le cas de Spirulina maxima, compte tenu des conditions d'alcalinité dans lesquelles elle a lieu. Dans cette étude de la nutrition carbonée en milieu basique, la saturation en lumière des suspensions d'algues sera alors assurée.

Chapitre I

L'ALGUE ET SA CULTURE

A partir des échantillons rapportés du Tchad, plusieurs repiquages sur gélose puis en milieu liquide ont été effectués de façon à isoler une souche unialgale de cette Cyanophycée. Tous les essais seront donc entrepris avec cette souche de Spirulina maxima.

I - DESCRIPTION SOMMAIRE DE L'ALGUE

La Spiruline se présente comme un filament simple, pluricellulaire et de forme hélicoïdale (photo 1). La longueur moyenne de l'algue comprenant 5 à 7 spires est de 250 μ ; le filament spiralé a un diamètre voisin de 10 μ. Quand les conditions du milieu changent cette algue montre de très grandes variations dans la morphologie et la taille : élargissement ou rétrécissement du pas de la spire, resserrement des spires centrales de l'hélice, détente du filament et même disparition de la forme spiralée, augmentation du nombre de spires bien au-delà de 50 par arrêt de la division de l'algue qui atteint ainsi plusieurs mm de long.

L'algue se déplace en se vissant dans l'eau (3). Le spectre d'absorption d'une suspension de Spirulina, entre 350 et 750 mμ (fig. 1) met en évidence les différents pigments : chlorophylle, caroténoïdes, phycoérythrine et phycocyanine. L'algue dans l'eau est d'une couleur vert foncé, la chlorophylle masquant les autres pigments. Mais lors de la conservation des algues sèches, celles qui sont exposées à la lumière laissent apparaître progressivement la couleur bleue de la phycocyanine.

II - MILIEU DE CULTURE - ENTRETIEN DE LA SOUCHE

A - Les conditions naturelles.

L'analyse des échantillons d'eau de la mare tchadienne (rapportés par l'expédition I.F.P.) a permis la détermination des éléments majeurs suivants :

- Cations en $mg.l^{-1}$: Na^+ = 9 640, K^+ = 545; total = 10 185
- Anions en $mg.l^{-1}$: HCO_3^- = 11 010, CO_3^{--} = 5 029, SO_4^{--} = 2 980, Cl^- = 1 000, NO_3^- = 120, PO_4^{---} = 64 ; total = 20 203.

La présence d'autres éléments, sous de très faibles concentrations, a pu être déterminée ; la teneur en p.p.m. des principaux est la suivante :

B = 1,0 ; Mo = 0,6 ; V = 0,2 ; Ni = 0,05 ; Co = 0,006 ; Ca = 0,6 ; Mg = 4

Les mesures de pH faites sur place, au Tchad, sont voisines de 9,5.

Dans la région d'Andjaram, les épaisses fleurs d'eau constituées par les Spirulines entre les mois d'avril et d'octobre, époque de la récolte, disparaissent durant la période fraîche qui correspond aussi à celle des hautes eaux. Par conséquent les algues se développent au maximum durant la période la plus chaude et la plus ensoleillée, et quand la salinité de l'eau est la plus élevée.

B - Composition du milieu synthétique.

A partir des données précédentes et des milieux divers pour cultures accélérées d'algues décrits dans la littérature, plusieurs solutions synthétiques ont été constituées. Le milieu synthétique retenu pour Spirulina contient tous les éléments indispensables à la vie de cette algue qui montre alors une croissance acceptable et une morphologie normale ; ce milieu comprend en $g.l^{-1}$: $NaHCO_3$ = 16,8 ; K_2HPO_4 = 0,5 ; $NaNO_3$ = 2,5 ; K_2SO_4 = 1,0 ; NaCl = 1,0 ; $MgSO_4$, 7 H_2O = 0,20 ; $CaCl_2$ = 0,040 ; $FeSO_4$, 7 H_2O = 0,010 ; E.D.T.A. = 0,080. A ces constituants il faut ajouter 1 $ml.l^{-1}$ de chacune des solutions A_5 et B_6.

Ces solutions d'oligoéléments indiquées par ARNON (15) contiennent en $g.l^{-1}$:

A_5 - H_3BO_3 = 2,86 ; $MnCl_2$, 4 H_2O = 1,81 ; $ZnSO_4$, 7 H_2O = 0,222 ; $CuSO_4$, 5 H_2O = 0,079 ; MoO_3 = 0,015

B_6 - NH_4VO_3 = 229,6 x 10^{-4} ; $K_2Cr_2(SO_4)_4$, 24 H_2O = 960 x 10^{-4} ; $NiSO_4$, 7 H_2O = 478,5 x 10^{-4} ; Na_2WO_4, A H_2O = 179,4 x 10^{-4} ; $Ti_2(SO_4)_3$ = 400 x 10^{-4} ; $CO(NO_3)_2$ 6 H_2O = 439,8 x 10^{-4}.

L'E.D.T.A. (acide éthylène diamine tétraacétique) est utilisé comme agent de chélation sous la forme de son sel disodique. Tous les sels utilisés pour la composition des milieux sont des produits MERCK ou PROLABO "pour analyses".

Ce milieu synthétique sera utilisé pour l'entretien des souches et comme milieu de référence (M.R.) lors de l'étude expérimentale de la croissance de Spirulina. Le pH initial de ce milieu est d'environ 8,4.

C - Entretien et utilisation de la souche.

Le milieu de culture est préparé avec de l'eau distillée, stérilisé dans l'autoclave pendant 30 mn à 130°C dans des boîtes de Roux de 1 litre contenant chacune 500 ml de milieu. Les précipités formés lors de la stérilisation (phosphates et carbonates de Ca, Mg et Fe principalement) sont redissous en faisant passer un courant de CO_2 dans le flacon. Les boîtes de Roux sont placées à 32°C en permanence, et reçoivent 12 heures sur 24 un éclairement d'environ 3 000 lux fourni par 2 tubes fluorescents de 40 W. Un barbotage d'air de 60 $l.h^{-1}.l^{-1}$ assure en même temps l'aération et l'agitation de la culture. Le pH de cette dernière varie de 8,4 au départ à environ 10,5 le 10e jour.

La croissance d'une culture en boîte de Roux présente (fig. 2) une première phase exponentielle, puis au bout de 2 ou 3 jours la concentration d'algues augmente linéairement. Celle-ci est voisine de 150 mg d'algues sèches par litre ($mg.a.s.l^{-1}$) au début de la culture et atteint près de 1200 $mg.a.s.l^{-1}$ au bout de 9 à 10 jours, au moment du repiquage. Les souches sont utilisées 9 à 11 jours après l'inoculation, durant la période de leur croissance linéaire.

Chapitre II

ETUDE EXPERIMENTALE. RESULTATS

Le travail expérimental est divisé en 2 parties. La première concerne l'étude de l'influence des facteurs physiques et chimiques sur le processus global de la croissance des cultures. Dans la seconde partie sont abordés divers aspects de la photosynthèse chez Spirulina maxima.

I - ETUDE DE LA CROISSANCE DES CULTURES

A - Méthodes de mesure de la croissance.

Parmi les nombreuses méthodes décrites dans la littérature (16) il est possible d'en retenir deux.

La Densité Optique (D.O.) de la suspension d'algues est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre "Spectral Junior" JOUAN. D'après le spectre d'absorption d'une suspension de spirulines (fig. 1) obtenu entre 350 et 750 mμ, la longueur d'onde choisie pour effectuer les mesures de D.O. se situe à 560 mμ, dans la zone d'absorption minimale. Il est vrai que la suspension de spirulines ne constitue pas une solution colorée homogène ; mais dans un domaine limité des concentrations, au-delà duquel il faut procéder à des dilutions, et quand la pigmentation et la taille des algues demeurent pratiquement constantes, la mesure relative de D.O. demeure correcte.

Le Poids sec est cependant l'expression quantitative la plus significative. Il est obtenu pour des parties aliquotes des cultures, après évaporation et séchage à poids constant dans l'étuve portée à 105°C, en tenant compte des sels apportés du milieu.

Une relation a été établie entre la D.O. et le poids sec. 1 unité D.O. correspond à 700 mg.a.s.l^{-1}. Les vitesses de croissance des cultures seront exprimées soit en ΔD.O.Δt^{-1}, soit en Δ mg.a.s.l^{-1}. Δt^{-1}.

Il est à noter qu'une nouvelle unité est utilisée, depuis quelques années, pour exprimer des concentrations d'algues : l'unité SHIBATA (appelée US) est définie par la quantité d'algues contenue dans un ml de suspension sous une épaisseur de un centimètre, qui donne avec le dispositif turbidimétrique utilisé à 560 mμ une densité optique de un (147). Dans le cas de Spirulina maxima 1 US correspond à 0,7 $mg.a.s.ml^{-1}$.

B - Appareillage et conditions d'étude de la croissance des algues.

1) Appareillage.

Le montage utilisé pour cette étude est divisé en 2 étages comprenant chacun 2 rampes de 12 flacons (photo 2). Chaque flacon est constitué par un tube de 4 cm de diamètre et 12 cm de long, dont la partie inférieure, de forme conique, est terminée par un capillaire calibré relié au tube d'arrivée du courant gazeux ; ainsi pour un débit de gaz donné un barbotage relativement uniforme de la suspension est-il assuré. Chaque rampe est éclairée par 2 tubes fluorescents de 40 W chacun (tubes PHILIPS Blanc Brillant de luxe), fixés dans un montage mobile permettant de faire varier l'intensité de l'éclairement par éloignement des tubes lumineux.

L'alimentation en gaz (air ou air + CO_2) et en lumière est indépendante pour chacune des rampes. Avant d'arriver à la rampe le courant gazeux passe par un système de manodétendeur, filtre de coton, débitmètre, mélangeur d'air + CO_2 et saturateur à eau ; le gaz traverse la suspension d'algues puis s'échappe du flacon de culture.

L'étude de l'influence de l'éclairement et des facteurs nutritifs est réalisée à température constante ($\pm$ 0,1°C) grâce à des bains-marie dans lesquels sont plongés les 12 flacons d'une même rampe. Mais dans le cas de l'étude de la température une thermorégulation indépendante a été adaptée à chacun des flacons d'une même rampe ; pour cela, au bouchon rodé du flacon est soudé un petit serpentin de verre plongeant dans la culture et relié à un thermostat (précision $\pm$ 0,1°C).

Pour l'étude de la température et des facteurs nutritifs l'éclairement des cultures est assuré par les tubes fluorescents cités précédemment. Ces tubes sont également utilisés lors des expériences concernant l'influence de la lumière jusqu'à 6000 lux ; mais pour des éclairements supérieurs (de 12 à 60 Klux) des lampes à incandescence de 300 W sont employées avec un système convenable de refroidissement.

2) Conditions d'étude de la croissance des algues.

Le milieu de référence (M.R.) est celui cité page 4 ; de nombreuses cultures en flacons de Roux ont montré que ce milieu contient tous les éléments nutritifs susceptibles d'être consommés par Spirulina maxima, à des concentrations bien supérieures aux besoins de l'algue. Sa richesse en bicarbonate, $[NaHCO_3] = 16,8\ g.l^{-1}$, empêche les variations de pH trop rapides. Il ne contient pas d'élément toxique étant donné que les souches, qui poussent dans ce même milieu, montrent une croissance et une morphologie très convenables.

Le volume de culture dans chaque flacon est de 100 ml.

Le débit du gaz de barbotage a été déterminé à la suite d'essais où on l'a fait varier entre 25 et 190 $l.h^{-1} . l^{-1}$. Un débit inférieur à 40 l ralentit la croissance des cultures quand celles-ci atteignent une certaine concentration en algues (D.O. $\simeq$ 2 pour 40 $l.h^{-1}. l^{-1}$). Entre 50 et 150 l le barbotage n'a aucune influence sur la croissance jusqu'à la D.O. $\simeq$ 3. Avec 190 $l.h^{-1}.l^{-1}$ les algues cassent et la culture est arrêtée au bout de 2 ou 3 jours. En conclusion il a été retenu un barbotage moyen de 80 $l.h^{-1}.l^{-1}$.

Une température constante (24 h sur 24) de 33°C a été choisie pour l'étude de l'éclairement et de la nutrition de l'algue, à la suite d'expériences sommaires sur l'influence de la température entre 25 et 35°C.

L'éclairement des cultures, mesuré avec un luxmètre, indique le nombre maximal de lux relevé à la surface éclairée du flacon. Lors de l'étude de l'influence de la température, les tubes de 40 W fournissent un éclairement maximal de 6000 lux. Mais pour celle des paramètres nutritifs, la présence du bac de régulation thermique réduit cet éclairement maximal à 5000 lux. Dans tous les cas l'éclairement est assuré 12 heures sur 24.

L'ensemencement est défini par la quantité d'inoculum introduite au départ des cultures ; on l'exprime par la mesure relative de D.O.i. Des essais préliminaires, réalisés dans le M.R. à 33°C et avec un barbotage de 80 $l.h^{-1}.l^{-1}$, ont montré que pour des éclairements de 5 ou 6 Klux la phase exponentielle de la croissance des cultures disparaît à partir d'une D.O.i de 0,30. On retiendra donc pour l'étude de la croissance des spirulines des D.O.i égales

ou supérieures à 0,30. Par conséquent l'apparition très rapide de la phase linéaire de la croissance permettra à la culture d'atteindre sans tarder sa vitesse maximale de croissance déterminée pour un éclairement limitant donné. Dans la nature, le développement des spirulines est probablement limité par une activité photosynthétique non saturante. Il est donc intéressant d'étudier ici l'influence de la température et des paramètres nutritifs sur une vitesse de croissance linéaire déterminée par le processus photochimique limitant.

C - Influence des facteurs physiques sur la croissance de l'algue.

1) Influence de l'intensité de l'éclairement.

L'étude est entreprise dans les conditions expérimentales citées précédemment : les flacons de culture sont maintenus à la température constante de 33°C dans un bain d'eau réglé par thermostat ($\pm$ 0,1°C). Chaque flacon contient 100 ml de M.R. et reçoit un barbotage d'air normal de 80 $l.h^{-1}.l^{-1}$.

L'influence des éclairements de 12 à 60 Klux est étudiée avec des cultures de D.O.i* = 0,50. Celle des plus faibles éclairements, de 1,5 à 5 Klux, est envisagée en fonction de diverses D.O.i comprises entre 0,05 et 0,88.

---

* D.O.i = Densité optique initiale

- Résultats:

TABLEAU I

Influence de l'éclairement sur la croissance des cultures de D.O.i diverses

Eclairement Klux	ENSEMENCEMENT des CULTURES						
	D.O.i	0,05	0,10	0,20	0,32	0,50	0,88
1,5	(A)	0,26	0,36	0,57	0,74	0,92	1,33
	(B)	0,07	0,09	0,12	0,14	0,14	0,15
	(C)	15	19	24	30	42	72
2,5	(A)	0,29	0,49	0,69	0,99	1,18	1,59
	(B)	0,08	0,13	0,16	0,22	0,23	0,24
	(C)	14	16	20	22	28	42
4,0	(A)	0,59	0,84	1,20	1,45	1,67	2,12
	(B)	0,18	0,25	0,33	0,38	0,39	0,41
	(C)	10	12	14	17	22	28
5,0	(A)	0,66	0,94	1,36	1,75	1,96	2,43
	(B)	0,20	0,28	0,39	0,48	0,49	0,51
	(C)	9 1/2	11	13	15	18	25

(A) D.O.f = densité optique finale, au bout de 3 jours de culture (ou 36 h d'éclairement).

(B) Δ D.O.J.$^{-1}$ = vitesse de croissance journalière, moyenne des 3 jours.

(C) C'est le temps de génération de l'algue (t.g.), temps au bout duquel la culture double sa masse initiale d'algues (17).

En exprimant les quantités d'algues par les D.O. relatives on peut écrire :

$$kt = \log \frac{D.O.f}{D.O.i} \qquad \text{ou} \qquad k = \frac{1}{t} \log \frac{D.O.f}{D.O.i}$$

k est la constante de croissance et t le temps d'éclairement (en heures).

$$t.g. = \frac{1}{k} \log 2 = \frac{0,3}{k} = \frac{0,3\ t}{\log \frac{D.O.f}{D.O.i}}$$

t.g. n'a de sens que lorsqu'il est constant, c'est-à-dire dans la période de croissance exponentielle ; cette phase logarithmique est sensible dans le cas des cultures de D.O.i = 0,05 puis s'estompe progressivement pour des D.O.i plus élevées. Dans les lignes (C) de ce tableau I on retiendra donc la meilleure valeur de t.g., celle correspondant à la D.O.i = 0,05.

TABLEAU II

Vitesse de croissance maximale et temps de génération minimal en fonction de l'éclairement

Klux	1,5	2,5	4,0	5,0	12	24	30	45	60
Δ_{Max} D.O.J^{-1}	0,15	0,25	0,41	0,51	0,85	1,15	1,20	1,20	1,15
t.g.m en h	15	14	10	9 1/2	8 1/2	7	6 3/4	6 3/4	7

Des tableaux I et II et de la figure 3 sont déduites les conclusions suivantes : avec des éclairements de 1,5 à 5 Klux la période de croissance exponentielle est presque supprimée à partir de la D.O.i = 0,32 (tableau I (B) et fig. 3,I). Le temps de génération le plus court chez Spirulina maxima est voisin de 7 h (tableau II).

La vitesse de croissance maximale de l'algue est égale à 1,2 D.O. par jour, soit 840 mg.a.s.l^{-1}.J^{-1} ; cette vitesse est atteinte avec une saturation lumineuse voisine de 30 Klux (tableau II, fig. 3,II). Mais dans les conditions expérimentales décrites les algues ne supportent pas trop longtemps de tels

éclairements. En effet dans les cultures soumises à des éclairements de 24 à 60 Klux il a été constaté vers le 3e jour un jaunissement puis une destruction des algues.

2) Influence de la température sur la croissance de l'algue.

Les 14 températures réparties entre 18 et 50°C sont comparées par groupes de 3. Chaque température étudiée est maintenue constante 24 h sur 24. Le flacon de culture, contenant 100 ml de M.R. de D.O.i = 0,50, reçoit un barbotage d'air normal de 80 $l.h^{-1}.l^{-1}$ et un éclairement de 6000 lux fourni 12 h sur 24 par les tubes fluorescents. Etant donné sa concentration initiale d'algues, 350 $mg.a.s.l^{-1}$, la culture aura son activité photosynthétique limitée par un tel éclairement. Le but de ces essais est donc d'étudier l'influence de la température sur la vitesse de croissance linéaire des cultures, vitesse correspondant à cet éclairement de 6 Klux. Les résultats sont mentionnés dans le tableau III.

De cette étude peuvent être tirées les conclusions suivantes (tab. III et fig. 4) .

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'optimum de température pour la croissance de Spirulina maxima se situe entre 32 et 40°C, soit au voisinage de 35°C. En dessous de 20°C la croissance est très lente et finit par s'arrêter, mais cette inhibition de la croissance cesse quand la température redevient favorable. A des températures permanentes $\geqslant$ 40°C les algues subissent des dommages irréversibles apparaissant au bout de 4 jours à 40°C et bien plus rapidement à des températures supérieures (tab. III). Mais maintenue uniquement durant les 12 h d'éclairement, avec en moyenne 25°C pendant la période obscure, la température de 40°C permet une croissance optimale de la culture sans affecter la morphologie des algues.

La figure 4 montre qu'entre 22 et 32°C la loi de croissance de l'algue est en accord avec l'équation d'ARRHENIUS : $v = f\, e^{-\frac{E}{RT}}$, où f est une fonction des concentrations du milieu de culture, de l'éclairement etc. L'énergie d'activation E du processus global de la croissance de l'algue est de 13,8 Kcal. Le coefficient de température Q_{10} c'est-à-dire l'augmentation proportionnelle de la vitesse due à une élévation de température de 10°C, est de 2,15 entre 22 et 32°C.

TABLEAU III

Temp. °C	T°K	$\frac{1}{T} \cdot 10^{-3}$	Δ_{Max} D.O.j^{-1} *	V_{Max} = mg.a.s.l^{-1}.j^{-1} **	log V_{Max}	Arrêt croissance au bout de
18	291	3,44	0,07	49	1,690	48 h (1)
20	293	3,41	0,15	105	2,021	90 h (1)
22	295	3,39	0,27	189	2,276	
25	298	3,36	0,36	252	2,401	
28	301	3,32	0,42	294	2,468	
30	303	3,30	0,49	343	2,535	
32	305	3,28	0,58	406	2,608	
33	306	3,27	0,59	413	2,616	
35	308	3,25	0,59	413	2,616	
40	313	3,19	0,58	406	2,608	96 h (2)
43	316	3,16	0,52	364	2,561	75 - 80 h
45	318	3,14	0,38	266	2,425	30 - 35 h
47	320	3,13	0,00	-	-	20 - 25 h
50	323	3,09	0,00	-	-	1 h

* Vitesse de croissance maximale exprimée en ΔD.O. par jour.

** Vitesse de croissance maximale exprimée en mg.a.s.l^{-1} par jour.

(1) Remises à 30°C les cultures repartent progressivement.

(2) Vers 40°C les spires de l'algue se resserrent excessivement et finissent vers le 4e jour par se disloquer en miettes. Cette destruction des algues, irréversible, est accélérée par l'élévation de la température au delà de 40°C.

Au cours d'un essai réalisé en maintenant la température de 40°C uniquement durant les 12 h d'éclairement, la vitesse de croissance est identique à celle obtenue dans le cas de 40°C en permanence, mais la première culture reste normale tandis que la seconde se détériore vers le 4e jour.

D - Influence des facteurs chimiques sur la croissance.

1) Rappel des conditions standards d'étude de la nutrition des algues.

Le montage utilisé pour cette étude est celui décrit antérieurement (photo 2). Chaque paramètre nutritif est étudié avec 6 concentrations différentes représentées chacune par deux flacons.

Dans les solutions employées pour ces essais tous les éléments nutritifs sont fournis à des concentrations identiques à celle du milieu de référence, de telle sorte que le seul facteur nutritif limitant soit le paramètre étudié. Chaque flacon de culture, contenant 100 ml de suspension de D.O.i. voisine de 0,30 ou 0,50, est maintenu à une température permanente de 33°C et reçoit un éclairement maximal de 5000 lux. Cette lumière limitante détermine une vitesse maximale de croissance des cultures.

L'étude de l'influence des facteurs chimiques est donc envisagée par rapport à cette vitesse de croissance linéaire. Chaque expérience (48 flacons de culture) sera suivie dans la plupart des cas durant 4 ou 5 jours, jusqu'à l'obtention d'une densité optique finale (D.O.f) voisine de 2,5.

2) Salinité du milieu de culture.

L'étude de l'influence de la concentration de certains éléments nutritifs peut conduire à des variations importantes dans la salinité totale du milieu. C'est essentiellement le cas du carbone introduit sous forme de $NaHCO_3$ (16,8 $g.l^{-1}$ dans M.R.).

Pour en évaluer l'importance, l'influence de la salinité sur la croissance des cultures est étudiée entre 0,8 et 86 $g.l^{-1}$ (tab. IV).

TABLEAU IV

INFLUENCE DE LA SALINITE SUR LA CROISSANCE DES CULTURES

Température 33°C - 5 000 lux - pH ≃ 9												
Appellation du milieu		S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7 M.R.	S_8	S_9	S_{10}	S_{11}	S_{12}
Composition du milieu en $g.l^{-1}$ (*)	Na_2CO_3	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106						
	$NaHCO_3$	0,084	0,084	0,084	0,084	0,084	0,084	16,8	33,6	50,4	50,4	67,2	67,2
	K_2HPO_4	0,087	0,087	0,087	0,087	0,087	0,087	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	$NaNO_3$	0,255	0,255	0,255	0,255	0,255	0,255	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	5,0
	K_2SO_4	0,087	0,087	0,087	0,087	0,087	0,087	1,0	1,0	1,0	3,0	1,0	3,0
	NaCl	0,059	0,590	1,180	2,36	4,72	7,08	1,0	1,0	1,0	10,0	1,0	10,0
	EDTA	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080
	$MgSO_4,7\ H_2O$	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
	$FeSO_4,7\ H_2O$	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
	$CaCl_2$	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040
Salinité totale ($g.l^{-1}$) (*)		0,828	1,359	1,949	3,129	5,49	7,85	22,1	38,9	55,7	69,2	72,5	86,0
D.O.i		0,50											
D.O.f (**)		(***)		0,62	0,82	0,96	1,10	1,30	1,30	1,30	1,20	1,12	0,98

(*) Il faut ajouter à chaque milieu du tableau, 1 $ml.l^{-1}$ de chacune des deux solutions d'oligo-éléments A_5 et B_6 (soit au total 5 $mg.l^{-1}$).

(**) D.O.f après 18 heures d'éclairement.

(***) Les cultures avec S_1 et S_2 ont périclité très rapidement (5-6 heures).

D'autres tests de salinité à $\simeq 7$ g.l^{-1}, mais avec des $[NaHCO_3]$ de 5 à 6 g.l^{-1}, ont montré des croissances comparables à celles de M.R. (S_7). Il est donc possible d'affirmer qu'entre 7 et 56 g.l^{-1} la salinité n'intervient pas sur la vitesse de croissance. Avec une salinité de 72,5 g.l^{-1} (S_{11}) la croissance des algues est encore acceptable.

3) Nutrition carbonée et pH.

Dans l'eau le carbone minéral existe sous plusieurs formes, CO_2, H_2CO_3, HCO_3^- et CO_3^{--}, en équilibre entre elles et dont les proportions varient suivant le pH du milieu (fig. 5). Ainsi la nutrition carbonée de l'algue est-elle directement liée au pH.

La source de carbone du M.R. est le $NaHCO_3$ fourni à la concentration de 0,2 mol.l^{-1} ou 16,8 g.l^{-1}. Si l'étude de l'influence de la $[C]$ est faite à partir de ce sel, il est possible de maintenir constante la $[Na]$ en employant le NaCl dont l'anion Cl^- ne s'est avéré nullement toxique à des doses relativement élevées (15 g.l^{-1} NaCl).

Les expériences sur la nutrition carbonée et le pH sont réparties en plusieurs étapes.

a) Influence de la nature du gaz de barbotage.

La nature du gaz de barbotage intervient dans les variations de pH du milieu et par conséquent dans le déplacement des équilibres du système carboné. Des essais ont été effectués en utilisant le M.R. (0,2 mol.l^{-1} $NaHCO_3$) et 5 courants gazeux différents : air normal, air + 1 % CO_2, N_2, O_2, CO_2. Il faut rappeler que le gaz barbote dans la culture puis s'échappe dans l'atmosphère.

- Résultats (fig. 6) :

Le courant gazeux ne contenant que du CO_2, provoque une destruction rapide de la culture dont le pH s'abaisse jusqu'à 6,5. Avec les 4 autres barbotages les vitesses initiales de croissance sont pratiquement identiques ; l'arrêt des cultures après 2 jours sous N_2 et O_2 correspond aux valeurs de pH supérieures à 11. L'air normal (près de 0,03 % de CO_2) ne semble pas contenir assez de CO_2 pour maintenir un pH $<$11 bien au-delà du 4e jour de culture.

Un barbotage d'air contenant environ 1 % de CO_2 permet de maintenir le pH vers 8,5.

b) Influence de la $[NaHCO_3]_i$ en fonction du % de CO_2 dans l'air.

Sont comparées tout d'abord 5 concentrations initiales en $NaHCO_3$: 0 mol.l^{-1} = 0 g.l^{-1} ; 0,05 mol. = 4,2 g. ; 0,1 mol. = 84 g. ; 0,2 mol. = 16,8 g ; 0,25 mol. = 21 g.

et chacune de ces $[NaHCO_3]_i$ est étudiée avec 3 barbotages différents :

air sans CO_2, air normal et air + 1 % de CO_2 (en volume)

L'air sans CO_2 est obtenu après passage dans de l'ascarite et une solution 10 N de KOH.

Une autre série d'expériences concerne les faibles $[NaHCO_3]_i$: 0 ; 0,084 ; 0,420 ; 0,840 ; 2,100 et 4,200 g.l^{-1}, avec les sortes de gaz de barbotage : air normal, air + 0,2 % CO_2 et air + 0,5 % CO_2 environ.

Au cours d'ultimes essais sont étudiées les trois $[NaHCO_3]_i$ suivantes : 84, 210 et 420 mg.l^{-1}, en réglant la teneur de CO_2 dans l'air de barbotage de telle sorte que le pH se maintienne aux environs de 8,3.

- Résultats :

La limite supérieure de pH tolérée par l'algue est 11,3-11,4 (fig. 7). La présence de $NaHCO_3$ dans le milieu de culture est nécessaire à la croissance des algues. Pour des $[NaHCO_3]_i \geqslant 0{,}05$ mol.l^{-1} (4,2 g.l^{-1}) et si on utilise de l'air exempt de CO_2 la culture périclite rapidement (fig. 7), alors que l'introduction de 1 % en volume de CO_2 dans l'air permet des croissances identiques quelle que soit la $[NaHCO_3]$.

Pour des $[NaHCO_3] < 4{,}2$ g.l^{-1} et avec un barbotage d'air normal les variations de pH sont brutales (fig. 8,I') et la culture est rapidement détruite. On considère que la vitesse de croissance optimale que l'algue peut atteindre dans les conditions expérimentales utilisées (avec un éclairement de 5000 lux) correspond à 0,5 D.O. par jour, soit 350 mg.a.s.l^{-1}.J^{-1}. Au cours des derniers

essais (tab. V) cette vitesse de croissance est obtenue pour une limite inférieure de pH située vers 8,3.

TABLEAU V

$[NaHCO_3]_i$ mg.l^{-1}	84			210			420		
Mesures de	pH	D.O.	Δ D.O	pH	D.O.	Δ D O	pH	D.O.	Δ D.O
Valeurs initiales	7,70	0,40		7,80	0,40		7,90	0,40	
Culture de 1 J	7,50	0,60	0,20	8,10	0,68	0,28	8,00	0,70	0,30
2 J	7,55	0,82	0,22	8,32	1,10	0,42	8,10	1,10	0,40
3 J	8,40	1,20	0,38	8,35	1,60	0,50	8,52	1,60	0,50
4 J	8,32	1,60	0,40	8,40	2,08	0,48	8,56	2,10	0,50
Δ_{Max} D.O.J^{-1}			0,40			0,50			0,50

Pour un milieu de culture contenant 840 mg.l^{-1} de $NaHCO_3$, cette valeur de pH est obtenue avec un barbotage d'air contenant près de 0,5 % de CO_2 (fig.8, III'). Si le milieu contient 420 mg.l^{-1} de $NaHCO_3$ il faut 0,2 % de CO_2 dans l'air (fig.8, II'). Pour des concentrations inférieures à 420 mg.l^{-1} (tab. V) le % de CO_2 n'a pas été mesuré avec précision. Malgré un pH de 8,3-8,4 la culture contenant seulement 84 mg.l^{-1} de $NaHCO_3$ ne parvient pas à atteindre la vitesse de croissance optimale (tab. V). Cette dernière peut être obtenue avec une $[NaHCO_3]_i$ de 210 mg.l^{-1}.

4) Nutrition azotée.

L'azote joue un rôle majeur dans la nutrition de l'algue puisque celle-ci contient environ 10 % de cet élément dans sa matière sèche. Différentes sources azotées minérales et organiques sont comparées ici. L'aspect quantitatif de la nutrition azotée est envisagée ensuite.

a) Influence de la nature de la source d'azote.

- Comparaison de divers aliments azotés, pour une même $[N]_i$.

A partir du milieu de référence sont composés 6 milieux différant par la nature du sel azoté mais contenant tous la même $[N]_i$.

TABLEAU VI

Nature et teneur des sources d'azote étudiées ($[N] = 420$ mg.l^{-1})

Nature du sel azoté	$NaNO_3$	$CO(NH_2)_2$	$NaNO_2$	NH_4NO_3	$(NH_4)_2SO_4$	NH_2-CH_2-COOH
[Sel azoté] g. l^{-1}	2,5	0,9	2,1	1,2	2,0	2,2

Les essais sont réalisés dans les conditions standards de température et d'éclairement, 33°C et 5000 lux, mais suivant 4 barbotages différents (soit des barbotages de 80 et 40 $l.h^{-1}.l^{-1}$ avec respectivement de l'air normal et de l'air contenant 1 % de CO_2 environ) permettant l'établissement de diverses conditions d'agitation et de pH.

De ces expériences les remarques suivantes peuvent être tirées (fig. 9) :

Les nitrates conviennent aux Spirulines dans tous les cas (les écarts de croissance notés en fin d'essai correspondent aux différences d'agitation des cultures).

L'urée est acceptable et comparable aux nitrates dans les graphiques I, III, IV ; avec le barbotage de 40 $l.h^{-1}.l^{-1}$ d'air normal la culture avec l'urée décline à partir du 3e jour, et l'on note en même temps un net dégagement de NH_3.

Le nitrite permet une croissance normale quand le pH augmente progressivement entre 8,4 et 10,3 ; mais il n'en est plus de même dans le cas d'air + CO_2 où le pH reste entre 8 et 8,5.

Dans les conditions I et II, NH_4NO_3 et $(NH_4)_2SO_4$ sont inacceptables. La culture avec le sulfate d'ammonium est détruite au bout de quelques heures ; celle avec le nitrate d'ammonium stagne 1 ou 2 jours avant de péricliter. Dans les deux cas NH_3 s'échappe des cultures.

A pH moins alcalin (III et IV) la croissance est meilleure avec NH_4NO_3 qu'avec $(NH_4)_2\ SO_4$ mais reste tout de même inférieure à la normale. En aucun cas le glycocolle ne s'est montré utilisable comme aliment azoté pour Spirulina maxima.

- Limites d'utilisation des sels azotés autres que $NaNO_3$.

Le nitrate de sodium s'étant avéré valable dans n'importe quelles conditions de culture, il est possible de déterminer pour l'urée, le nitrite et les sels d'ammonium les possibilités de leur emploi comme sources d'azote pour Spirulina maxima. Des essais avec des teneurs en glycocolle allant de 0,5 à 2,2 $g.l^{-1}$ ont tous abouti à une destruction rapide des cultures. Chacun des aliments azotés est testé à des concentrations variables et à diverses valeurs de pH. Tous les essais sont réalisés à 33°C, 5000 lux, avec un barbotage de 80 $l.h^{-1}.l^{-1}$, et une D.O.i = 0,50.

TABLEAU VII

Utilisation de l'urée et de $NaNO_2$.

Nature du sel azoté		$CO(NH_2)_2$			$NaNO_2$		
$[\text{sel azoté}]_i$ $g.l^{-1}$		0,9	1,8	3,6	2,1	4,2	6,3
$[N]_i$ $mg.l^{-1}$		420	840	1680	420	840	1680
Air normal pHi = 8,4 pHf = 10,3	D.O. après 1 J	1,02	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95
	D.O. après 2 J	1,54	1,50	1,40	1,52	1,48	1,40
	D.O. après 3 J	1,98	1,90	(X)	2,00	1,90	1,80
Air + 1 % CO_2 pH 8,4	D.O. après 1 J	1,01	1,00	0,98	0,70	0,65	0,63
	D.O. après 2 J	1,54	1,53	1,50	0,90	0,80	0,75
	D.O. après 3 J	2,08	2,06	1,80	(X)	(X)	(X)

(X) Destruction des algues, arrêt de la culture.

Avec un barbotage suffisant pour permettre l'évacuation de NH_3 formé, l'urée peut être utilisé en milieu très alcalin jusqu'à des teneurs voisines de 2 $g.l^{-1}$. Les nitrites sont acceptables jusqu'à près de 6 $g.l^{-1}$ mais uniquement avec un barbotage d'air normal n'empêchant pas l'élévation progressive du pH au-delà de 10.

TABLEAU VIII

Utilisation des sels d'ammonium (essais à pH $\simeq$ 8,3).

Sel azoté	NH_4NO_3				$(NH_4)_2 SO_4$		
[Sel azoté] $g\ l^{-1}$	0,3	1,2	2,4	4,8	0,5	2,0	6,0
$[N]_i$ $mg.l^{-1}$	105	420	840	1680	105	420	1260
D.O. après 1 J	1,02	0,92	0,76	0,52	1,02	0,65	(X)
D.O. après 2 J	1,55	1,45	1,23	(X)	1,55	1,08	(X)
D.O. après 3 J	1,96	2,00	1,70	(X)	1,80	1,60	(X)

De tous les flacons on note un dégagement de NH_3 accéléré par le barbotage. Il semble préférable d'utiliser les sels d'ammonium à faible dose de façon à éviter une toxicité par accumulation importante de NH_3 dans le milieu.

b) Influence de la [N] sur la vitesse de croissance des cultures

Etant donné les résultats précédents, l'étude est faite avec NO_3^- comme source d'azote.

Une première série d'essais est appliquée aux $[N]_i$ allant de 0 à 165 $mg.l^{-1}$. Les expériences suivantes concernent de fortes $[N]_i$, allant de 1200 à 3300 $mg.l^{-1}$.

- Résultats :

On constate que dans les conditions opératoires citées : la vitesse de croissance augmente avec la $[NaNO_3]$ introduite (fig. 10,I et fig.11, I) puis

atteint sa valeur maximale entre 800 et 7500 $mg.l^{-1}$ et diminue ensuite pour les teneurs plus élevées allant jusqu'à 20 $g.l^{-1}$ (fig. 10,II, fig. 11,I) ; l'absence de nitrate inhibe la croissance de la culture, et cette carence provoque une chlorose de l'algue qui conserve toutefois sa morphologie normale.

5) Influence de K, Na et du rapport K/Na.

a) Influence du K sur la croissance des cultures.

Il s'agit d'étudier l'influence des très faibles [K] sur la vitesse de croissance et de déterminer éventuellement un rôle toxique de la part des [K] trop élevées. Pour étudier la croissance des cultures en milieu faiblement ou fortement potassique, les sels de K du milieu de référence sont remplacés par des sels de Na (Na_2HPO_4, 12 H_2O et Na_2SO_4) et le K n'est introduit que sous la forme de KCl suivant des quantités bien déterminées, sachant que la [Cl] est sans influence.

Les essais sont réalisés dans les conditions standards déjà précisées. Le tableau IX se rapporte à l'influence des faibles $[K]_i$, le tableau X à celle des $[K]_i$ élevées.

TABLEAU IX

[KCl] $mg.l^{-1}$	0	10	20	50	100	500
[K] $mg.l^{-1}$	0	5,2	10,4	26	52	260
D.O. initiale	0,50					
D.O. au bout de 1 J	0,70	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00
D.O. au bout de 2 J	(X)	1,26	1,50	1,52	1,50	1,50
D.O. au bout de 3 J	(X)	(X)	1,90	2,00	2,00	2,00

(X) la carence en K est accompagnée par un élargissement des spires, un jaunissement puis une destruction des algues. L'absence de K dans le milieu est observée en moins de 2 jours. Les faibles [K] ne semblent pas influer sensiblement sur la vitesse de croissance des cultures.

TABLEAU X

[KCl] g.l^{-1}	2,5	5	10	15	20	25
[K] g.l^{-1}	1,3	2,6	5,2	7,8	10,4	13
D.O. initiale	0,50					
D.O.f (au bout de 4 J)	2,40	2,40	2,20	1,96	1,96	2,00

Un léger ralentissement de la croissance se dessine donc à partir de 10 g.l^{-1} de KCl.

b) Influence du Na sur la croissance des cultures.

Les sels de K sont substitués à tous les sels de Na du M.R., K_2HCO_3, KNO_3, KCl, excepté le sel disodique de l'EDTA apportant une quantité négligeable de Na.

Na est introduit sous la forme de NaCl.

En l'absence de sels de sodium la destruction des algues est très rapide ; donc Na est indispensable à la culture de Spirulina maxima. De fortes [Na] n'ont montré aucune toxicité même quand [Na] = 18 g.l^{-1} (milieu S_{10} du tableau IV).

c) Etude du rapport K/Na.

La destruction très rapide des algues privées de Na fait penser plutôt à une action toxique qu'à un effet de carence ; le K étant le cation principal des milieux exempts de Na, il y a tout lieu de croire à une toxicité de K en l'absence de Na, d'où l'intérêt d'étudier l'influence du rapport K/Na sur la croissance des algues.

Plusieurs milieux de culture sont composés de façon à obtenir des valeurs différentes de K/Na.

Dans le tableau XI figurent les principaux sels des divers milieux utilisés ; seules les teneurs de KCl ou NaCl sont à ajouter de manière à obtenir le rapport K/Na désiré.

TABLEAU XI

Appellation du milieu		A	B	C	D	E	F	G
K_2CO_3 (*)	$g.l^{-1}$	1,38	10,0	5,0			4,14	4,14
$NaHCO_3$	"				16,8	4,20		
KNO_3	"	3,00	3,00	3,00			4,00	4,00
$NaNO_3$	"				1,75	2,50		
K_2HPO_4	"	0,50	0,50	0,50			1,00	1,00
Na_2HPO_4, 12 H_2O	"				0,90	0,90		
K_2SO_4	"	0,50	0,50	0,50			1,00	2,00
Na_2SO_4	"					1,00		
KCl	"	0,50	1,00	1,00	(**)	(**)	1,00	3,00
NaCl	"	(**)	(**)	(**)			(**)	(**)
EDTA Fe, Ca, Mg, A_5, B_6		identique au milieu de référence						

(*) le K_2CO_3 est préalablement passé sous CO_2 pour être transformé en $KHCO_3$.

(**) les teneurs en KCl et NaCl sont déterminées en fonction du K/Na à réaliser.

Tous les essais sont réalisés à 33°C sous un éclairement de 5000 lux et avec une D.O.i de 0,4 ou 0,5. Le pH est maintenu pendant la culture entre 8,1 et 10,6 par barbotage d'air normal ou d'air enrichi en CO_2 selon les cas.

Les résultats sont reproduits dans le tableau XII.

TABLEAU XII

Milieu	$[K]$ mg.l^{-1}	$[Na]$ mg.l^{-1}	$\frac{K}{Na}$	Δ_{Max} D.O.J^{-1}
B	7840	0	$+\infty$	
C	4990	0	$+\infty$	
A	2670	0	$+\infty$	
B	7840	39	200	(*)
B	4990	98	51	
A	2670	192	14	
G	6830	920	7,5	
B	4990	780	6,4	0,40 (**)
B	7840	1560	5,0	0,50
F	5340	1840	2,9	0,51
D	5200	5200	1,0	0,50
D	2600	5200	0,5	0,52
D	520	5200	0,1	0,51
D	26	5200	0,005	0,52
E	6	2290	0,0026	0,50 (***)
D	0	5200	$-\infty$	0,23 (****)

(*) destruction des algues, d'autant plus rapide que $K/Na \longrightarrow +\infty$.

(**) destruction des algues vers le 5e jour.

(***) arrêt de la croissance le 3e jour ; spires larges et jaunissement.

(****) arrêt de la culture le 2e jour ; mêmes signes de carence en K.

Il ressort de ce tableau que la valeur optimale du rapport K/Na doit être inférieure ou égale à 5.

Plus précisément, l'influence du rapport K/Na sur la vitesse de croissance des algues a été étudiée entre 1 et 8. Les milieux utilisés pour cette étude sont mentionnés dans le tableau qui suit.

TABLEAU XIII (*)

N° d'essai		Essai I	Essai II	Essai III
$NaHCO_3$	$g.l^{-1}$	4,200	2,100	4,200
$NaNO_3$	"	2,000	1,000	2,000
Na_2HPO_4, 12 H_2O	"	0,500	0,250	0,500
NaCl	"	0,410	0,205	0,410
KCl	"	(**)	(**)	(**)
K/Na		5 à 8	5 à 7,5	1 à 5

(*) EDTA, Fe, Ca, Mg, A_5 et B_6 sont apportés à des teneurs identiques à celles du M.R.

(**) la $[KCl]$ est déterminée en fonction du rapport K/Na désiré.

Au cours de ces essais effectués à 33°C et sous 5000 lux, un barbotage d'air enrichi en CO_2 permet de maintenir le pH vers 8,5. Toutes les cultures dont le rapport K/Na est compris entre 1 et 5 ont montré des croissances identiques. Mais l'augmentation du rapport de 5 à 8 a une influence défavorable sur la vitesse de croissance (fig. 12) ; la comparaison des essais I et II (fig. 12) avec les résultats du tableau X montre que c'est bien le rapport K/Na et non pas la $[K]$ élevée qui détermine le ralentissement de la croissance quand $K/Na > 5$.

6) Influence de Cl et des autres halogènes.

a) Influence de la [Cl] sur la vitesse de croissance.

$Ca(NO_3)_2$, 4 H_2O est substitué à $CaCl_2$ comme source de Ca dans le M.R. L'étude du chlore est faite à partir de NaCl.

Les faibles [Cl] ont une influence marquée sur la vitesse de croissance des cultures (fig. 13) ; il faut un minimum de 32 $mg.l^{-1}$ de Cl pour assurer une croissance normale à la culture. L'absence de Cl dans le milieu se caractérise par un resserrement très accentué des spires de l'algue suivi de la destruction de celle-ci. Il est à noter que cette inhibition de la culture apparaît bien plus rapidement que dans le cas des carences en d'autres éléments nutritifs ; et ceci malgré la présence probable dans le milieu, de traces de Cl introduites comme impuretés des autres sels.

Des essais entrepris avec de fortes [Cl] n'ont révélé aucune toxicité de cet élément vis-à-vis des algues ; d'ailleurs il a été utilisé précédemment des [Cl] de 12 $g.l^{-1}$ (tableau X).

b) Comparaison de Cl, Br et I.

Il s'agit de savoir s'il est possible de remplacer Cl par un autre halogène. L'étude est réalisée à partir des sels KCl, KBr et KI suivant les conditions standards de culture déjà citées.

TABLEAU XIV

Appellation du milieu		A	B	C	D	E	F
$g.l^{-1}$	KCl	1			1	1	
	KBr		1		1		1
	KI			1		1	1
D.O.i		0,36					
D.O.f (après 3 J)		1,80	1,76	(*)	1,76	1,78	1,60
Δ_{Max} D.O.J^{-1}		0,50	0,48	0,04	0,48	0,48	0,43

(*) Arrêt de la culture au bout de 30 h ; symptômes de la carence en Cl.

D'après le tableau XIV, Br seul peut être substitué à Cl ; mais l'iode seul ne convient pas du tout. Le mélange Br + I semble ralentir un peu la croissance ; mais les mélanges Cl + Br et Cl + I donnent des résultats comparables à ceux du M.R.

7) Influence des autres éléments du milieu.

Tous les essais relatifs à P, Ca et Mg sont réalisés à un pH voisin de 8,5 de façon à réduire les risques de précipitation de ces éléments en milieu trop alcalin.

a) Influence de [P] et [S] sur la croissance des cultures.

Des $[K_2HPO_4]$ variables sont utilisées pour l'étude du P. Pour celle du S le sulfate de magnésium est remplacé par le chlorure de magnésium et le sulfate ferreux par le chlorure ferreux ; le S est introduit sous forme de K_2SO_4. Les conditions expérimentales, les différentes concentrations des éléments étudiés et les résultats des essais relatifs à P et S sont indiqués sur la figure 14.

La carence en P ressemble beaucoup à celle en S ; les algues montrent un élargissement des spires accompagné d'une chlorose ; de plus le nombre de spires double rapidement.

Dans les conditions expérimentales décrites il n'a pas été possible de discerner une influence de [P] ou de [S] sur la vitesse de croissance des cultures.

D'autres essais ont été entrepris avec des $[K_2HPO_4]$ et $[K_2SO_4]$ allant dans chaque cas jusqu'à 5 $g.l^{-1}$; aucune influence particulière sur la culture n'en a été déduite.

b) Influence de [Ca] et [Mg].

L'étude du Ca a été conçue pour six teneurs différentes de $CaCl_2$. Celle du Mg avec six concentrations de $MgSO_4$, 7 H_2O. Tous les renseignements concernant ces essais sont rassemblés figure 15.

La carence en Ca se manifeste moins rapidement que celle en Mg. La première ne présente pas pour les algues des modifications morphologiques très nettes en dehors d'une tendance au gigantisme. Mais la carence en Mg ressemble

beaucoup à celles en P ou en Mg.

L'influence de [Ca] ou de [Mg] sur la vitesse de croissance n'est pas apparente dans le cadre expérimental utilisé.

c) Influence de l'EDTA, du Fe et des oligoéléments.

Tous ces essais sont réalisés à 33°C et sous un éclairement de 5000 lux ; un barbotage d'air + 1 % CO_2 permet de maintenir le pH du milieu vers 8,5 ; la D.O.i varie de 0,35 à 0,50 suivant les cas.

1-Influence de la [EDTA] sur la croissance des cultures.

L'étude est faite avec le sel disodique de l'éthylène diamine tétra-acétique. Comme le montre le tableau XV, l'absence d'EDTA dans ces conditions de culture n'a pas de conséquence sur la croissance. Entre 0 et 260 p.p.m. la [EDTA] n'influe pas sur la culture. A de plus fortes concentrations une toxicité apparaît.

TABLEAU XV (*)

[EDTA] $mg.l^{-1}$	0	65	195	260	325	455
D.O. après 1 J	0,70	0,68	0,69	0,70	0,69	0,63
D.O. après 2 J	1,18	1,17	1,20	1,18	1,18	1,00
D.O. après 3 J	1,69	1,68	1,71	1,70	1,70	1,20
D.O.f (4 J)	2,18	2,18	2,20	2,16	2,00	(**)
Δ_{Max} $D.O.J^{-1}$	0,51	0,51	0,51	0,52	0,52	0,32

(*) la D.O.i est égale à 0,35

(**) destruction des algues.

2-Influence de la [Fe] sur la croissance des cultures.

Les diverses [Fe] sont fournies par le $FeSO_4$, 7 H_2O.

TABLEAU XVI (*)

$[FeSO_4, 7\ H_2O]$ mg.l^{-1}	0	5	10	20	40	80 (**)
[Fe] mg.l^{-1}	0	1	2	4	8	16
D.O. après 1 J	0,78	0,77	0,78	0,78	0,79	0,77
D.O. après 2 J	1,28	1,28	1,28	1,28	1,28	1,26
D.O. après 3 J	1,76	1,78	1,80	1,80	1,80	1,78
D.O.f (4 J)	2,10	2,30	2,30	2,30	2,30	2,30
Δ_{Max} D.O.J^{-1}	0,50	0,51	0,52	0,52	0,52	0,52

(*) D.O.i = 0,40

(**) à cette concentration une partie du sulfate ferreux précipite et un léger trouble se produit dans le milieu de culture.

La [Fe] n'agit pas sur la vitesse de croissance des cultures et la carence en Fe ne commence à se faire sentir qu'au bout du 4e jour; elle se manifeste par un gigantisme et un jaunissement des algues.

3-Etude des oligoéléments .

Les expériences sont faites à partir des solutions A_5 et B_6 utilisées pour le M.R.

TABLEAU XVII (*)

$[A_5]$ ml.l^{-1}	0	1	5	10	15	20
D.O. après 1 J	0,63	0,63	0,64	0,63	0,62	0,60
D.O. après 2 J	1,15	1,14	1,15	1,15	1,00	0,98
D.O. après 3 J	1,68	1,67	1,67	1,68	1,40	(**)
D.O.f (4 J)	2,16	2,20	2,20	2,20	1,76	(**)
Δ_{Max} D.O.J^{-1}	0,53	0,53	0,53	0,53	0,40	0,38

(*) les [EDTA] et $[B_6]$ sont identiques à celles du M.R. ; D.O.i = 0,35

(**) destruction des algues, jaunissement et arrêt de la culture.

Le tableau précédant montre que la solution A_5 est nettement toxique à une concentration de 20 $ml.l^{-1}$, et un peu moins à 15 $ml.l^{-1}$.

La solution B_6, par contre, ne montre aucune toxicité à 40 $ml.l^{-1}$; seule une légère diminution de la croissance apparaît en fin d'essai avec une concentration de 80 $ml.l^{-1}$ (tabl. XVIII).

TABLEAU XVIII (*)

$[B_6]$ $ml.l^{-1}$	0	1	10	20	40	80
D.O. après 1 J	0,88	0,88	0,89	0,89	0,88	0,88
D.O. après 2 J	1,40	1,41	1,40	1,41	1,40	1,40
D.O. après 3 J	1,90	1,93	1,92	1,93	1,93	1,90
D.O.f (4 J)	2,40	2,42	2,40	2,42	2,42	2,30
Max $D.O.J^{-1}$	0,52	0,53	0,52	0,52	0,53	0,52

(*) Les [EDTA] et $[A_5]$ sont les mêmes que dans M.R. ;
D.O.i = 0,50

Pour déceler l'origine de la toxicité de A_5 il faut étudier chacun de ses constituants séparément. Les résultats de cette étude figurent dans le tableau de la page suivante.

TABLEAU XIX (*)

Nature du sel	H_3BO_3	$MnCl_2$, 4 H_2O	$ZnSO_4$, 7 H_2O	$CuSO_4$, 5 H_2O	Mo O_3
[sel] $mg.l^{-1}$	57	36	4,5	1,6	0,3
D.O. initiale	0,40				
D.O. après 1 J	0,87	0,66	0,87	0,60	0,81
D.O. après 2 J	1,40	1,06	1,40	(**)	1,23
D.O. après 3 J	1,92	1,48	1,90	(**)	1,66
Δ_{Max} D.O.J^{-1}	0,52	0,42	0,53	0,20	43

(*) Chaque sel est introduit dans le M.R. à une concentration correspondant à la sienne dans 20 $ml.l^{-1}$ de A_5.

(**) Destruction totale des algues.

D'après ces résultats, outre une légère action toxique due à Mn et Mo, c'est essentiellement le Cu qui se montre très nocif à la culture quand celle-ci contient 1,6 $mg.l^{-1}$ de $CuSO_4$, 5 H_2O.

II - ETUDE DE LA PHOTOSYNTHESE CHEZ SPIRULINA MAXIMA

Dans l'étude précédente la lumière limitait la croissance des cultures si bien que l'influence des paramètres nutritifs et de la température s'exerçait sur une vitesse de croissance linéaire déterminée par le processus photochimique limitant. L'étude envisagée à présent concerne spécialement la réaction de photosynthèse chez Spirulina maxima ; l'influence de certains facteurs sur l'activité photosynthétique de l'algue sera déterminée par contre, dans des conditions de saturation lumineuse. L'intérêt de cette étude découle des résultats précédents relatifs à la croissance des cultures de Spirulina maxima en milieu très basique. Les conséquences de cette alcalinité apparaîtront nettement, aussi bien dans les méthodes utilisées pour l'étude de la photosynthèse chez cette algue qu'à propos des résultats de cette étude.

A - Vérification du quotient photosynthétique en milieu basique.

1) Appareillage et méthode de mesure.

Le montage expérimental est représenté dans la figure 16. Le réacteur de photosynthèse (A) peut contenir 150 ml de suspension. Les calories libérées par la lampe à incandescence de 300 W (F) sont absorbées dans leur presque totalité par un écran d'eau à circulation permanente (G) puis par un filtre anticalorique "ATHERVEX Ta M.T.O., Paris" (H). Le système d'agitation magnétique (E, e) est à vitesse réglable. Par les passages rodés (a_1 et a_2) pénètrent l'électrode de verre et celle au calomel reliées au pH mètre (I) type TS_7 Tacussel. A ce dernier est relié l'ensemble de titrage automatique "Urectron 4 Tacussel" (J,K,L) ; ce matériel permettra occasionnellement d'expérimenter à pH constant. Le récipient contenant les algues (A) et la burette calibrée (B) sont maintenus à une température constante grâce à un thermostat (à $\pm$ 0,1°C).

Méthode de mesure du quotient photosynthétique :

Le quotient photosynthétique, Qp, est défini par la relation :

$$Qp = \frac{\Delta O_2}{-\Delta CO_2} = \frac{\text{Production d'}O_2}{\text{consommation de } CO_2}$$

La mesure de O_2 est faite suivant la méthode manométrique. Etant donné le pH du milieu, les variations de pression engendrées par la photosynthèse ne sont dues qu'à la production d'O_2 ; cette dernière étant mesurée avec la burette calibrée.

La mesure de $-\Delta CO_2$ est obtenue par alcalimétrie. D'après l'équilibre $HCO_3^- \rightleftharpoons CO_2 + OH^-$, la consommation d'une mol. de CO_2 dans ces conditions d'alcalinité correspond à la disparition d'un ion HCO_3^-. Il suffit donc de doser les ions HCO_3^- de la suspension avant et après la période de photosynthèse pour déterminer ΔHCO_3^- et par conséquent ΔCO_2. Si on veut mesurer $-\Delta CO_2$ par le dosage des ions CO_3^{--}, d'après le schéma: $CO_3^{--} + H_2O \longrightarrow CO_2 + 2\ OH^-$, on obtient la correspondance d'une molécule de CO_2 pour 2 ions OH^-. Le dosage des ions HCO_3^- est fait avec un pH mètre (précision 0,01 unité pH) dans l'intervalle de pH 8,3 à 4 (18) avec une solution 0,1 N de H_2SO_4. Les corrections dues à la respiration des algues sont supprimées dans la mesure de Q_p ; en effet l'erreur faite sur ΔO_2 est compensée par celle sur ΔCO_2 (en admettant le quotient respiratoire $Q_R = \frac{\text{Production de } CO_2}{\text{Absorption d'}O_2} = 1$).

2) Résultats :

TABLEAU XX

Milieu (*)	Volume suspension ml	Durée essai mn	Valeurs de pH pHi	Valeurs de pH pHf	ΔO_2 (**) 10^{-4} mol.	ΔHCO_3^- (***) ml. H_2SO_4 0,1 N	$-\Delta CO_2$ (****) 10^{-4} mol.	$Q_p = \frac{\Delta O_2}{-\Delta CO_2}$
1	150	180	10,75	11,40	12,9	4,40	13,2	0,98
2	150	180	10,75	11,45	14,6	4,65	13,9	1,05
3	150	140	8,40	9,45	20,8	6,62	19,9	1,05
4	100	140	8,42	9,85	15,8	7,50	15,0	1,05
5	100	160	8,35	10,30	22,7	10,95	21,9	1,04
6	100	180	8,39	10,15	19,8	9,45	18,9	1,04
7	150	160	8,30	9,70	20,2	6,60	19,8	1,02
8	150	385	8,30	11,05	47,6	15,20	45,6	1,04
9	150	360	8,30	11,00	41,6	13,46	40,4	1,03
10	150	205	8,42	8,88	18,4	6,37	19,1	0,96

(*) Les milieux sont composés comme suit (en $g.l^{-1}$) :
(1) = 2,65 Na_2CO_3 + 10,0 NaCl ; (2) = 4,2 Na_2CO_3 + 10,0 NaCl ;
(3) = M.R. avec 4,2 $NaHCO_3$ + 10 NaCl et $NaNO_3$ comme source d'azote ;
(4) = M.R. avec 4,2 $NaHCO_3$ + 10 NaCl et l'urée comme source d'azote ;
(5) = 4,2 $NaHCO_3$ + 10 NaCl ; (6) = M.R. avec 4,2 $NaHCO_3$ + 6 NaCl ;
(7) = identique à (5) ; (8) = 4,2 $NaHCO_3$; (9) = 2,1 $NaHCO_3$; (10)=M.R.

(**) Avec correction de la pression barométrique.

(***) Ecart entre le dosage initial et le dosage final des ions HCO_3^-, pour une partie aliquote de 50 ml.

(****) 1 ml H_2SO_4 0,1 N correspond à 10^{-4} HCO_3^- ou 10^{-4} mol.CO_2.

Tous ces essais, réalisés à 32°C, avec un éclairement maximal de 60 Klux à la surface éclairée du réacteur, et pour une concentration en algues de la suspension égale à 1750 $mg.a.s.l^{-1}$ (D.O. = 2,5), fournissent une valeur moyenne de Q_P égale à $1 \pm 0,05$.

La composition du milieu de la suspension n'influe pas sur le résultat de la mesure du Q_P pour la durée de l'expérience.

Le pH augmente durant la photosynthèse à une vitesse variable suivant la teneur en bicarbonate-carbonate du milieu.

B - Mesure du rendement quantique par une méthode calorimétrique.

Si la photosynthèse, P, est exprimée en molécules de CO_2 réduit ou d'O_2 dégagé, et la lumière absorbée, Ia, est mesurée en einsteins, le rapport $\gamma = \frac{P}{Ia}$ est appelé rendement quantique.

Si l'on rapporte la photosynthèse à la chaleur de combustion des sucres produits, $-\Delta Hc$, et Ia est exprimée en calories, l'expression $\varepsilon = \frac{-\Delta Hc}{Ia}$ correspond au facteur de conversion de l'énergie. La relation entre γ et ε s'écrit (19) :

$$\varepsilon = -\Delta Hm\,\gamma \,.\, N_A h \nu^{-1} = 3,96 \times 10^{-3}\, \lambda m\mu\, \gamma$$

avec $-\Delta Hm$ = chaleur de combustion molaire d'un groupe $\{CH_2O\} \simeq 112$ Kcal ; $N_A = 6,02 \times 10^{23}$; $h = 6,55 \times 10^{-27}$; $\nu = 3,00 \times 10^{17} \times \lambda m\mu^{-1}$.

1) Appareillage et méthode de mesure.

Un montage conçu initialement pour l'étude cinétique des réactions chimiques suivant la méthode thermique différentielle (20) est utilisé pour la mesure du rendement quantique de Spirulina maxima d'après la méthode calorimétrique. Une description détaillée de l'appareillage figure dans une publication récente (21). Afin de comparer cette méthode calorimétrique à la méthode manométrique plus couramment utilisée pour mesurer γ, il a été adapté à la sortie du réacteur contenant les algues un système de mesure manométrique de la production de O_2 avec suiveur de niveau et enregistreur potentiométrique.

La mesure de P est donc obtenue à partir du dégagement de O_2 ; mais à la production apparente de O_2 il faut apporter la correction de la respiration afin d'avoir la vraie valeur de P. C'est pourquoi parallèlement à chaque essai d'évaluation du rendement quantique réalisé avec une suspension donnée, une mesure de la vitesse de respiration pour un volume identique de la même suspension est effectuée dans l'appareil de photosynthèse (fig. 16) placé dans le noir.

La mesure de Ia et de ε est faite selon la méthode thermique différentielle. En appelant ΔH l'énergie lumineuse totale absorbée par la suspension correspondant à Ia exprimé en einsteins , ΔHt la partie de l'énergie totale convertie en chaleur et ΔHc la partie convertie en énergie chimique (cette partie correspondant à la chaleur latente de combustion des sucres formés), on peut écrire :

$$\Delta Hc = \Delta H - \Delta Ht \quad \text{et} \quad \varepsilon = \frac{\Delta Hc}{\Delta H}$$

Dans la cuve calorimétrique sont placés deux flacons identiques contenant, le premier de l'eau distillée, le second un même volume d'une suspension de spirulines très concentrée (assimilable à un corps noir).

La ligne de base B (fig. 17) correspond au zéro du galvanomètre établi quand le système est à l'obscurité, ce qui annule l'effet thermique dû éventuellement à la respiration des algues ; de toutes façons en plaçant à l'obscurité les deux réacteurs contenant des suspensions identiques, mais l'une d'algues vivantes et l'autre d'algues mortes, aucun effet thermique n'est alors perceptible.

Quand l'appareil est illuminé avec une lampe à vapeur de Na ($\lambda = 589 m\mu$) de 60 W, il se dessine (fig. 17) un palier P_1 correspondant à la partie de l'énergie convertie directement en chaleur, ΔHt.

L'introduction de 0,5 ml de formol 30 % dans le réacteur contenant les algues, provoque la mort de celles-ci. La suspension est assimilable alors à un simple corps noir inerte transformant en chaleur toute la lumière absorbée, ce qui se traduit sur le graphique par le palier P_2 correspondant à l'énergie totale ΔH (ou Ia) absorbée par la suspension.

Connaissant ΔH et ΔHt, on en déduit $\Delta Hc = \Delta H - \Delta Ht$. Pour déterminer $\varepsilon = \frac{\Delta Hc}{\Delta H} = \frac{\Delta H - \Delta Ht}{\Delta H}$, il suffit de mesurer les hauteurs des paliers P_1 et P_2 ; $\varepsilon = \frac{P_2 - P_1}{P_2}$. A partir de la relation $\varepsilon = 3{,}96 \times 10^{-3} \lambda m\mu \gamma$ il est possible de calculer le rendement quantique γ. Afin de vérifier le γ obtenu par cette méthode calorimétrique, il faut se reporter à l'expression $\gamma = \frac{P}{Ia}$, où P est mesuré manométriquement et Ia correspond au ΔH exprimé en einsteins.

Pour connaître la valeur absolue de ΔH, il suffit de réaliser un étalonnage (simulation électrique) avec une sonde de résistance connue par laquelle un courant d'intensité donnée est envoyé dans la suspension d'algues. Le graphique montre alors le palier E correspondant à l'énergie produite lors de cet étalonnage.

$$\Delta H = \frac{RI^2 t \times P_2}{E} \text{ en calories } (P_2 \text{ et } E \text{ en mm})$$

si $\lambda = 589 m\mu$, 1 einstein correspond à 48 Kcal ; d'où :

$$Ia = \frac{\Delta H \text{ (calories)}}{48 \times 10^3} \text{ einsteins}$$

TABLEAU XXI

Conditions expérimentales			Rendement quantique Méthode calorimétrique					Rendement quantique Méthode manométrique							
								Etalonnage				$\frac{\Delta H}{RI^2 txP^2}$			
(1)	(2)	(3)	P_1 (ΔH_t)	P_2 (ΔH)	P_2-P_1 (ΔH_c)	$\frac{P_2-P_1}{P_2}$	$\frac{x\ 10^3}{3,96x\ m}$	R	I	RI^2	E	$\frac{\Delta H}{RI^2 txP^2}$	Ia	$P_{(*)}$	$\frac{P}{Ia}$
mg	mn	mn	mm	mm	mm	ε %	γ_c	Ω	10^{-3}xA	W	mm	E calories	10^{-4}einstein	10^{-4}mol.	γ_m
210	120	180	73	81	8,0	9,9	0,042	54,5	93	0,47	62	1061	221	9 3	0,042
110	100	140	67	74,5	7,5	10,0	0,043	56,7	93	0,49	62	848	177	7.6	0,043
100	126	150	54	60	6,0	10,0	0,043	56,0	93	0,48	62	843	176	7,7	0,044
Valeur moyenne						10 %	0,0427	Valeur moyenne							0,043
Nombre moyen de quanta (γ_c^{-1})							23,4	Nombre moyen de quanta (γ_m^{-1})							23,3

(1) Poids sec d'algues dans 120 ml de milieu ($NaHCO_3$ 4,2 + NaCl 10 $g.l^{-1}$).

(2) Durée de l'éclairement avec lampe Na (λ = 589 mμ).

(3) Durée de l'essai avec algues vivantes (avant addition du formol).

Le premier essai a été réalisé à 32,5°C, le second à 33°C, le troisième à 32°C

(*) P = production apparente d'O_2 + correction respiration pour la durée de l'essai avec algues vivantes.

Les résultats obtenus par les deux méthodes sont donc très voisins. Cet accord peut signifier que l'énergie absorbée chimiquement et le dégagement de O_2 sont proportionnels c'est-à-dire qu'il n'y aurait pas d'autre processus chimique utilisant l'énergie lumineuse que ceux impliqués par le dégagement de O_2. La précision des déterminations est très correcte avec les deux méthodes, $\gamma = 0{,}043 \pm 0{,}001$.

C - Influence de divers facteurs sur la photosynthèse.

1) Etude des conditions expérimentales.

On veut définir les conditions optimales d'étude de la photosynthèse avec le montage expérimental utilisé (fig. 16).

a) Les premiers essais permettent de déterminer une influence éventuelle de la nature des sels de la solution.

TABLEAU XXII (*)

Milieux		A	B	C	D	E
$g.l^{-1}$	K_2HCO_3	14	14			
	$NaHCO_3$			16,8	4,2	M.R.
	NaCl		5		10	(**)
Vitesse production O_2 (***) 10^{-4} $mol.h^{-1}$		(****) 3,25	9,80	9,95	9,90	9,92

(*) Essais de 120 mn ; avec 130 ml de suspension ; pH constant 8,4 ; 35°C ; 60 Klux.

(**) Milieu de référence de la page 4.

(***) Pour les 130 ml de suspension.

(****) Dans ce milieu A ne contenant que K_2HCO_3 la production de O_2 diminue progressivement jusqu'à s'arrêter complètement au bout de 90 mn.

En présence de NaCl l'inhibition de la photosynthèse disparaît ; avec toutes les solutions les vitesses de photosynthèse sont comparables à celle de M.R. ; le milieu retenu pour l'étude de la photosynthèse sera le milieu D de la page 39, Na HCO_3 4,2 $g.l^{-1}$ + NaCl 10 $g.l^{-1}$, qui permet d'observer des variations sensibles du pH.

b) Influence de la salinité sur la vitesse de photosynthèse.

L'étude est faite avec 130 ml de suspension de D.O = 0,7, à 33°C, sous un éclairement maximal de 60 Klux, durant 60 mn et à pH constant 8,4. A partir des résultats obtenus (tabl. XXIII) il sera admis que la salinité du milieu ($NaHCO_3$ 4,2 + NaCl 10 $g.l^{-1}$), soit 14,2 $g.l^{-1}$, est convenable.

TABLEAU XXIII

$g.l^{-1}$	$NaHCO_3$	1,0					
	NaCl	0	2	4	8	12	16
Salinité totale $g.l^{-1}$		1	3	5	9	13	17
Vitesse photos. 10^{-4} mol. O_2 (*)		6,07	6,80	7,11	7,89	7,92	7,97

(*) pour 130 ml de suspension.

c) L'agitation des 130 ml de suspension se fait à une vitesse suffisante dans la position maximale de l'agitateur magnétique (tabl. XXIV) quand la D.O. de la suspension est de l'ordre de 0,5 à 1,0.

TABLEAU XXIV (**)

[algues] en unités D.O.		0,50	0,56	0,86	1,04	1,56
Vitesse de photosynthèse en 10^{-4} x mol.O_2.h^{-1}. (130 ml suspension)$^{-1}$						
AGITATION	(A)	6,09				
	(B)	6,35	6,62	7,98	8,33	8,99
	(C)(*)	6,35	6,63	8,02	8,38	9,14

(*) La position (C) correspond à la vitesse maximale d'agitation fournie par l'agitateur magnétique employé.

(**) Les essais sont réalisés sous 60 Klux, à 35°C, à pH 8,4 et durant 60 mn.

d) Concentration en algues de la suspension, en fonction de l'éclairement.

L'éclairement maximal fourni par la lampe de 300 W, dans le dispositif décrit figure 16, est de 60 Klux. Les résultats des essais, entrepris afin de connaître la densité algale pour laquelle cet éclairement est saturant, indiquent (fig. 18) que la vitesse maximale de production apparente d'O_2 est maintenue, avec 60 000 lux, jusqu'à la D.O. $\simeq$ 0,75. Pour des D.O. supérieures la lumière devient limitante.

e) Influence de la température.

D'après les résultats relatifs à la croissance des cultures, l'optimum de température pour Spirulina maxima se situe entre 32 et 40°C. Jusqu'à présent les essais de photosynthèse ont été réalisés entre 32 et 35°C. L'étude abordée à présent concerne 11 températures réparties entre 18 et 50°C.

TABLEAU XXV (*)

Temp °C	T °K	$10^{-3} \times \frac{1}{T}$	Production O_2 μmol.h^{-1} (**)	V μmol.h^{-1}.mg.a.s^{-1}	log V
18	291	3,44	290	4,14	0,617
23	296	3,38	485	6,93	0,841
25	298	3,36	570	8,14	0,911
28	301	3,32	672	9,60	0,982
30	303	3,30	750	10,71	1,030
33	306	3,27	880	12,57	1,099
35	308	3,25	933	13,33	1,125
40	313	3,19	1062	15,17	1,171
45	318	3,14	904	12,91	1,111
47,5	320,5	3,12	452	6,46	0,810
50	323	3,09	(***)		

(*) Chaque température est maintenue constante à 0,1°C près.

Pour chacun des essais une même quantité d'inoculum est prélevée d'un même flacon de souches, filtrée puis récupérée dans 130 ml de milieu (4,2 g.l^{-1} $NaHCO_3$ + 10 g.l^{-1} NaCl) ; la suspension obtenue a une D.O. de 0,77, soit 70 mg.a.s dans 130 ml ; elle est agitée à la vitesse maximale (position C), reçoit un éclairement saturant de 60 Klux et est maintenue à pH constant 8,35.

La pression atmosphérique est relevée au cours de chaque essai pour la correction des résultats.

(**) Pour 130 ml de suspension.

(***) Destruction des algues au bout de 45 mn ; la production d'O_2 à 47,5°C a cessé après 75 mn.

La température optimale pour la photosynthèse est 40°C (tabl. XXV, fig. 19,II). Entre 23 et 33°C la loi d'ARRHENIUS s'applique bien à la vitesse de production d'oxygène (fig. 19,III). L'énergie d'activation est trouvée égale à 10,7 Kcal.mol^{-1}, et le coefficient de température Q_{10} (entre 23 et 33°C) est de 1,81.

2) Influence du pH et de la source de carbone sur la photosynthèse.

Comme pour l'étude de la croissance, ces deux paramètres ne peuvent être dissociés.

a) Existe-t-il une $[C]$ limite au-dessous de laquelle la photosynthèse n'est pas possible ?

Pour le mettre en évidence on utilise un milieu contenant exclusivement NaCl (12 g.l^{-1}) puis des milieux contenant NaCl et des quantités croissantes de $NaHCO_3$. Il est nécessaire chaque fois de laver l'inoculum avec la solution de NaCl (12 g.l^{-1}) afin d'éliminer au maximum les traces de HCO_3^- et CO_3^{--} provenant du milieu de la souche. L'expérience se déroule jusqu'à l'arrêt total du dégagement d'O_2. Si le rapport O_2 produit/C introduit est égal à 1 c'est que tout le C a été consommé, auquel cas il n'existe pas de $[C]$ minimal pour assurer la photosynthèse. Les essais sont réalisés soit à pH constant soit à pH variable. La température constante de 40°C et l'éclairement maximal de 60 Klux sont assurés au cours de tous ces essais.

Aux erreurs expérimentales près le rapport trouvé (tabl. XXVI) est voisin de 1 et ceci pour des valeurs de pH entre 8,3 et 11,4 ; quelle que soit la concentration en $NaHCO_3$ (de 92 à 2400 mg.l^{-1}) tout le C introduit sous cette forme est consommé.

TABLEAU XXVI

pH	Quantité de C introduite (*)		Production totale d'O_2 (*)		$\frac{\mu mol.\ O_2}{\mu mol.\ C}$
	mg $NaHCO_3$	μmol. C	ml O_2 à 40°C	μmol. O_2	
8,4	12	143	3,78	147	1,03
8,4	23	274	7,03	274	1,00
8,4	34	405	10,34	402	0,99
8,4	55	655	17,20	669	1,02
10,2 (**)	55	655	17,36	675	1,03
9,0 à 10,9 (**)	109	1286	33,89	1318	1,02
8,3 à 11,4	302	3595	92,54	3600	1,00

(*) pour 130 ml de suspension

(**) le pH initial est réajusté avec NaOH, N.

b) Etude de la [C] entre 0,01 et 0,5 mol.l^{-1} à des pH divers et constants.

Cette étude est réalisée dans des conditions d'éclairement saturant. L'échelle de pH étudiée va de 8,5 à 11,5. Divers mélanges $NaHCO_3$ + Na_2CO_3 sont composés en fonction du pH voulu. Dans le cas des faibles [C] la salinité est réajustée avec NaCl.

TABLEAU XXVII

(Température 40°C - Eclairement max. 60 Klux - 130 ml suspension, D.O. = 0,60)

$[C]$ mol.l^{-1}	0,01		0,025		0,05		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5	
pH constant	Vitesse de photosynthèse en μmol.h^{-1} . mg.a.s^{-1}															
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
8,5	14,6	14,7	15,9	15,5	16,0	15,8	14,8	14,6	15,5	15,3	15,2	14,8	15,5	15,3	15,6	15,4
9,0	14,5	14,7	16,0	15,4	15,8	15,5	15,4	15,0	16,0	15,6	15,6	15,2	15,7	15,3	15,4	15,0
9,5	10,9	10,0	14,3	13,5	15,2	14,9	15,4	15,1	16,0	15,8	16,0	15,5	15,4	15,0	12,3	11,8
10,0	8,7	8,2	11,1	10,2	12,8	12,0	14,5	14,0	15,0	14,5	14,6	14,0	12,8	11,7	9,4	8,0
(*) 10,5	5,9	4,8	8,4	7,2	11,0	10,3	8,9	9,0	11,2	10,6	8,5	7,5	6,1	3,0	5,2	2,3
(**) 11,0	4,0	1,6	5,1	3,8	6,9	5,3	5,4	4,1	6,0	3,6	3,4	1,1	0,4	0,1	0	0
(***) 11,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A = vitesse initiale calculée à partir des 15 premières minutes d'essai.
B = production d'O_2 au bout des 60 mn d'essai.

(*) Au pH 10,5 la suspension a dégénéré totalement après 50 mn dans le cas de $[C]$ = 0,4 mol.l^{-1}, et après 40 mn dans le cas de $[C]$ = 0,5 mol.l^{-1}.

(**) A pH 11 la destruction des algues est apparue comme suit en fonction de la $[C]$: en 40 mn à 0,2 mol.l^{-1}, 20 mn à 0,3, 10 mn à 0,4 et 5 mn à 0,5.

(***) A pH 11,5 quelle que soit la $[C]$ du milieu la suspension périclite très rapidement : donc en aucun cas les spirulines ne supportent un tel pH.

Au cours d'autres expériences à pH 10,5 et 11 avec les fortes [C] 0,4 et 0,5 mol.l^{-1} les suspensions ont été placées à l'obscurité ; également dans ce cas les algues ont été détruites.

Les valeurs B du tableau XXVII (production d'O_2 en 60 mn d'essai) sont portées sur la figure 20 en fonction de la [C] pour les différents pH. De cette figure on peut déduire les concentrations en carbone permettant d'atteindre la photosynthèse maximale en fonction du pH du milieu. Cette vitesse de photosynthèse maximale (environ 15 μmol.h^{-1}.mg.a.s^{-1}) peut être obtenue jusqu'à pH 10 ; au-delà de ce pH elle décroît jusqu'à devenir nulle à pH 11,5.

A des pH convenables (8,5 ou 9) la [C] n'a aucune influence sur la vitesse de photosynthèse, entre 0,01 et 0,5 mol.l^{-1} de C.

c) Influence de la [C] entre 0 et 0,1 mol.l^{-1} à pH 8,5.

Le pH d'une solution de 13 g.l^{-1} NaCl est ajusté à 8,5 avec de la potasse. Les souches d'algues sont lavées à de nombreuses reprises avec cette solution de façon à en éliminer les traces de HCO_3^- et CO_3^{--}. Des volumes de 130 ml de suspension de D.O. = 0,64 (58 mg.a.s dans 130 ml) sont introduits dans le réacteur de photosynthèse.

Le carbone est apporté ensuite à partir d'une solution mère de $NaHCO_3$ concentrée. Les essais sont réalisés à 40°C, avec l'éclairement saturant de 60 Klux. Le pH est maintenu constant à 8,5 grâce au titrage automatique (Urectron 4). Les trois premières mesures de production d'O_2 sont faites chaque 5 mn. L'évaluation de la vitesse de photosynthèse en μmol.h^{-1} est faite à partir du résultat des 5 premières minutes.

TABLEAU XXVIII

[C] mol.l^{-1}	0	0,0005	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,01
mg. $NaHCO_3$ dans 130 ml de suspension	0	5,5	11	22	33	44	55	110
Production totale d'O_2 en µmol. (**)	0	66	134	265	398	526	670	1336
Production d'O_2 les 5 premières mn ; µmol.	0	25	51	61	70	73	72	73
Vitesse photosynthèse µmol.h^{-1}.mg.a.s^{-1}	0 (*)	5,2	10,6	12,7	14,5	15,1	14,9	15,1

(*) L'absence totale de dégagement d'O_2 quand la [C] = 0 permet de juger de l'efficacité du lavage préalable des souches avec la solution de NaCl dont le pH a été réajusté à 8,5.

(**) Il s'agit de la production d'O_2 correspondant à l'épuisement total du C introduit dans le réacteur (comme dans tabl. XXVI).

Il ressort de ces essais que la vitesse maximale de photosynthèse est atteinte à partir de 3 à 4 mmol.l^{-1} de C.

d) Etude du pH entre 7 et 8,5.

Entre pH 7 et 8 la vitesse de croissance des spirulines est nettement ralentie (courbes de pH fig. 8) ; c'est pratiquement à partir de pH 8 que la culture se développe à son rythme optimal.

Tous les essais précédents de photosynthèse ont été réalisés à des pH $\geq$ 8,5 pour s'assurer que la teneur de CO_2 libre dans le réacteur est négligeable ; mais si l'on veut étudier l'influence du pH entre 7 et 8,5 il faut alors tenir compte du fait que les variations de pression enregistrées par le manomètre peuvent ne pas être dues au seul dégagement d'O_2.

A partir des données qui suivent (tabl. XXIX) le pourcentage de CO_2 libre à 40°C peut être évalué.

TABLEAU XXIX (*)

Température °C		0	10	20	30
% de C sous forme de CO_2 libre	pH 7,0	27,8	22,7	20,0	18,2
	pH 7,5	10,5	8,6	7,2	6,6
	pH 8,0	3,8	2,9	2,4	2,1
	pH 8,5	1,2	0,9	0,7	0,7

(*) D'après RILEY et SKIRROW (22). Ces données sont basées sur les valeurs de pH de l'échelle SØRENSEN (psH) ; la relation entre psH et l'échelle moderne de pH est : pH = psH + 0,04. Dans le cas présent cet écart est négligeable.

A partir de ce tableau on estime qu'à 40°C la fraction molaire de CO_2 libre est voisine de 18 % à pH 7,0 ; 6 % à pH 7,5 ; 2 % à pH 8,0 et 0,7 % à pH 8,5.

L'étude de l'influence du pH entre 7 et 8,5 est résumée dans le tableau XXX.

TABLEAU XXX (*)

pH constant	7	7,5	8,0	8,5
$[C]_i$ dans 130 ml µmol.	1 300			
$[CO_2$ libre$]_i$ maximum µmol.	234	78	26	9
Production totale d'O_2 en 60 mn µmol. (**)	660	720	803	808
Vitesse photosynthèse $\mu mol.h^{-1}.mg.a.s^{-1}$	12	13,1	14,6	14,7

(x) Les essais sont effectués avec 840 $mg.l^{-1}$ de $NaHCO_3$ correspondant à une $[C]$ de 0,01 $mol.l^{-1}$. La température est de 40°C et l'éclairement maximal de 60 Klux pour 130 ml de suspension de D.O. = 0,60.

(xx) Par 130 ml de suspension, en supposant que les variations manométriques ne soient dues qu'à la production d'O_2 ; car avant d'être éclairée la suspension est agitée pour en libérer le CO_2 dissous jusqu'à l'obtention d'un équilibre manométrique.

En comparant les 3e et 4e lignes du tableau XXX, l'intervention du CO_2 libre ne peut être sensible qu'à pH 7, nettement moins à pH 7,5 et négligeable à partir de pH 8. Mais la libération préalable du gaz carbonique de la suspension dans l'atmosphère du réacteur permet de réduire considérablement l'erreur possible lors de la mesure de l'O_2 dégagé. Vu que cette erreur ne peut se produire que par excès on constate de toutes façons que la vitesse maximale de photosynthèse n'est atteinte qu'à partir de pH 8. La figure 21 résume l'ensemble des essais relatifs à l'influence du pH et la $[C]$ sur la photosynthèse de Spirulina maxima.

C h a p i t r e III

INTERPRETATION DES RESULTATS - DISCUSSION

Il faut souligner que tous les résultats relatifs à la croissance des cultures de Spirulina maxima ont été obtenus avec des suspensions unialgales mais non exemptes de bactéries.

I - INFLUENCE DES FACTEURS PHYSIQUES SUR LA CROISSANCE DES CULTURES

A - La température.

Spirulina maxima est une algue nettement thermophile. Ceci est conforme avec ses conditions de vie naturelles au Tchad.

Parmi tous les groupes d'algues, d'une façon générale les auteurs admettent que la thermophilie caractérise principalement les Cyanophycées qui constituent d'ailleurs les formes de vie prédominantes dans les sources chaudes (23). Ces dernières sont souvent alcalines et il semble que la tolérance à des températures élevées soit en relation avec ce facteur (24). Des algues bleues ont été citées comme vivant à 55, 60 et même 85°C (26 à 28).

Des travaux ont été orientés en particulier vers des cyanophycées ayant des croissances optimales à 35-40°C et des temps de génération relativement courts ; c'est le cas d'Anacystis nidulans (t.g = 2 h) étudiée par KRATZ et MYERS (29) et celui d'Oscillatoria subbrevis (t.g = 3 h) citée par MOYSE et coll. (30). La spiruline admet le même optimum de température que ces deux espèces mais le temps de génération minimal obtenu pour cette algue, dans les conditions expérimentales décrites, est voisin de 7 h.

D'après MARRE (31) l'adaptation des algues bleues à la thermophilie ne serait pas sans relation avec la position phylogénitique primitive de ces organismes ; les Bactéries, qui constituent avec les Cyanophycées l'embranchement des Schizophytes, font partie des autres formes de vie pouvant tolérer des températures physiologiquement trop élevées (voir l'influence de la température sur la croissance des cultures de colibacilles d'après MONOD (32)).

B - L'éclairement.

Il a été étudié dans des conditions de nutrition et de température où il est seul limitant.

En dehors des temps de génération exceptionnels de 2 h et 3 h atteints par les algues bleues Anacystis nidulans et Oscillatoria subbrevis, celui de Spirulina maxima d'environ 7 h est voisin de ceux obtenus pour d'autres Cyanophycées telles que Nostoc muscorum et Anabaena variabilis soit respectivement 8 et 6 h (29).

A propos de l'intensité de la lumière saturante l'interprétation ne peut être donnée que si l'on tient compte des conditions expérimentales. Etant donné, en effet, le mode d'agitation de la culture, la forme et les dimensions du flacon, et le fait que seule une partie de ce flacon de culture reçoive la lumière incidente, il faut mesurer 25 à 30 Klux à la surface de cette partie éclairée pour atteindre la saturation lumineuse. Donc en réalité, seulement une fraction de la culture reçoit directement la lumière incidente suivant un rythme dépendant de l'agitation. En opérant avec des tubes contenant 10 ml de culture KRATZ et MYERS (29) ont obtenu à 5000 lux la saturation lumineuse pour Anacystis nidulans. Il est généralement admis que pour les cellules d'algues recevant directement la lumière incidente la phase linéaire d'accroissement de la vitesse de photosynthèse, en fonction de l'intensité lumineuse, s'étend jusqu'à près de 1000 lux ; au-delà se dessine le plateau de saturation ; et pour les forts éclairements se manifestent les phénomènes de photooxydation accompagnés d'une décomposition de la chlorophylle (33). De plus l'effet inhibiteur dû à des éclairements trop intenses est lié à la température ; c'est ainsi que la souche thermophile de chlorella (34) est inhibée par 11 Klux à 25°C mais ne l'est pas sous 33 Klux à 39°C. Dans les conditions opératoires citées, la vitesse de croissance maximale de Spirulina maxima (1,2 D.O.J^{-1} ou 840 mg.a.s. $J^{-1}.l^{-1}$) est atteinte sous un éclairement de 25-30 Klux (fig. 3,II) qui finit par inhiber vers le 3e jour la progression de la culture ; il faut préciser que cette inhibition se produit à 33°C mais quand la concentration d'algues est voisine de 2,1 g.a.s.l^{-1}, ce qui provoque un ralentissement de l'agitation et par conséquent une exposition plus longue et moins fréquente des algues à la lumière. Il est possible que dans d'autres conditions d'agitation, permet-

tant une intermittence adéquate des périodes lumineuses et obscures, les algues supportent plus longtemps des éclairements aussi importants.

Au laboratoire, pour chaque éclairement donné la D.O. initiale influe sur la production d'algues en fin d'essai et sur la vitesse moyenne de croissance des cultures (tabl. I) ; les écarts observés ici sont dûs à la brièveté des essais (3 jours) car si l'on prolongeait ces derniers les différences s'estomperaient progressivement. La période de croissance exponentielle n'est sensible que dans les cultures de faible $D.O_i$ (fig. 3,I) ; si, au cours d'essais en laboratoire sous des éclairements de 5000 lux, on désire atteindre très rapidement la phase de croissance linéaire il faut choisir des $D.O_i \geqslant 0,3$. La vitesse de croissance linéaire correspond, pour un éclairement donné, à la vitesse de croissance maximale de la culture. La valeur de cette vitesse est indépendante de la $D.O_i$, et dans les conditions optimales de nutrition et de température elle n'est liée qu'à l'éclairement. Il a été vu, dans le domaine expérimental décrit, que sous une lumière de 25 à 30 Klux la vitesse de croissance linéaire de Spirulina maxima atteint la valeur maximale de 840 $mg.a.s.l^{-1}.J^{-1}$.

En supposant réalisée dans les mêmes conditions optimales une culture de Spirulina maxima de 1 m^2 de surface et 5 cm d'épaisseur, on obtiendrait théoriquement une production d'algues de 42 g.a.s par m^2 et par jour (12 h d'éclairement), soit 126 T par Ha et par an pour 300 jours de culture maintenus dans les mêmes conditions.

II - INFLUENCE DES PARAMETRES CHIMIQUES SUR LA CROISSANCE DES CULTURES

A - La salinité du milieu.

La Spiruline montre (tabl. IV) une grande tolérance (7 à 56 $g.l^{-1}$) vis-à-vis de la teneur en sels du milieu et de la répartition de ces sels ($NaHCO_3$ et NaCl par exemple). Il faut rappeler que le milieu naturel du Tchad est une eau très saumâtre (30 $g.l^{-1}$ de sels environ). Si la salinité de certaines eaux saumâtres est voisine de celle de l'eau de mer, la répartition des sels par contre peut différer considérablement entre les deux cas (34). C'est ainsi que la mare du Tchad est essentiellement composée de bicarbonate et carbonate de Na, avec seulement 1 $g.l^{-1}$ de Cl^-.

La tolérance de Spirulina pour les fortes salinités n'est pas exceptionnelle puisque certaines algues résistent à des concentrations égales ou supérieures à 3 fois celle de l'eau de mer (35). En outre cette relative tolérance de Spirulina correspond à une caractéristique commune à de nombreuses Cyanophycées.

B - La nutrition carbonée et le pH .

L'interprétation de la nutrition carbonée sera principalement abordée dans le paragraphe concernant la photosynthèse chez Spirulina maxima. La discussion présente est limitée à l'influence du pH, de la $[NaHCO_3]_i$ et de la teneur en CO_2 du gaz de barbotage sur la vitesse de croissance des cultures. Ces trois paramètres sont liés entre eux mais il est possible de discerner le rôle spécifique joué par chacun de ces facteurs. Il faut rappeler que toutes les expériences ont été réalisées en aérobiose ; en effet le bouchon rodé du flacon de culture est ouvert à son extrémité effilée pour permettre l'évacuation, dans l'atmosphère, des gaz de barbotage.

Le pH du milieu augmente durant la croissance des cultures qui reçoivent un barbotage d'air normal (0,03 % de CO_2) ou d'un autre gaz exempt de CO_2 (fig. 6 et 7). L'influence de cette élévation du pH dans le milieu de culture peut être multiple :

Le pH joue un rôle direct sur l'algue qui doit admettre des limites physiologiques d'acidité et d'alcalinité du milieu. Pour la croissance de Spirulina maxima ces limites vont de 8-8,3 à 11-11,3 (fig. 6, 7 et 8 et tabl. V). Un autre aspect du rôle physiologique du pH concerne l'influence de la vitesse de variation du pH ; en effet les algues admettent très bien les variations lentes, progressives, du pH (en milieu riche en bicarbonate et carbonate) mais elles sont détruites à la suite de variations brutales du pH obtenues en milieu faiblement tamponné (fig. 8,I'). De plus le pH influence indirectement la croissance de l'algue en intervenant dans la solubilité de certains éléments nutritifs ; les carbonates et phosphates de Ca, Mg et Fe en particulier ont tendance à précipiter quand le pH du milieu augmente. Le pH est également lié à la répartition des différentes formes du système carboné, CO_2, HCO_3^- et CO_3^{--} (fig. 5). Les causes de l'élévation du pH du milieu sont également mul-

tiples : l'expulsion du CO_2 dissous dans le milieu, par les gaz de barbotage (un barbotage d'air normal dans M.R. sans algues élève le pH de ce M.R. jusqu'à 9,6 environ) ; l'activité photosynthétique des algues c'est-à-dire l'utilisation de la source carbonée ; l'assimilation des nitrates par les algues, libérant des ions OH^- (36). Ces variations du pH sont liées à la $[NaHCO_3]_i$ de la culture et à la nature du gaz de barbotage.

La concentration initiale de $NaHCO_3$ dans la culture n'a aucune influence sur la vitesse de croissance des algues entre 0,0025 et 0,25 $mol.l^{-1}$, quand les conditions de pH sont acceptables (fig. 7 et 8, tabl. V). Par contre, malgré un pH convenable, la vitesse de croissance est réduite de 20 % quand : $[NaHCO_3]_i$ = 0,001 $mol.l^{-1}$ (tabl. V). Mais aucun effet toxique n'a été signalé en présence de 50 $g.l^{-1}$ de $NaHCO_3$ (tabl. IV). La photosynthèse constitue souvent le principal facteur limitant de la croissance ; or dans le cadre expérimental choisi, avec un éclairement maximal de 5000 lux, l'activité photosynthétique n'est pas maximale et pour mieux apprécier l'influence de la concentration de la source carbonée il faut se référer aux essais de photosynthèse.

La richesse en CO_2 du gaz de barbotage doit être déterminée en fonction de la $[NaHCO_3]_i$ du milieu de façon à obtenir un pH convenable pour la croissance des algues.

De toutes ces remarques il ressort que la culture de Spirulina maxima n'est possible qu'en milieu alcalin et que par conséquent le CO_2 y est essentiellement présent sous les formes ionisées HCO_3^- et CO_3^{--}. De très longue date la nécessité d'un milieu basique a été reconnue pour la plupart des Cyanophycées (37, 38) ; de nombreux travaux plus récents ont confirmé cette remarque (39 à 43). ALLEN (44) a signalé l'existence d'une souche d'oscillaire qui ne croît qu'à pH 10-11, tandis que la majorité des algues bleues testées se comporte aussi bien à pH 8-8,5 qu'à pH 10-11. L'intervalle de pH pour la croissance optimale de Microcystis aeruginosa se situe, comme chez Spirulina, entre 8 et 11 (45).

Beaucoup d'études ont porté sur le rôle du pH du milieu dans la physiologie des algues (46 à 50). Dans le cas de Spirulina le ralentissement de la croissance à pH $<$ 8 peut être dû, comme on le verra plus loin, à une diminution de l'activité photosynthétique. Quant à la destruction rapide des algues

à pH 11,3-11,5 elle ne peut s'expliquer que par un bouleversement complet de la physiologie de l'algue. Le pH intracellulaire de l'algue se maintient normalement au voisinage de la neutralité malgré les variations du pH extérieur ; quand ce dernier atteint des valeurs proches de 11,3 il se peut que le pH interne de l'algue subisse une modification néfaste conduisant à la destruction de l'organisme.

La tolérance de Spirulina pour les $[NaHCO_3]$ élevées est en accord avec les conditions de vie naturelles de cette algue. L'analyse des eaux de la mare tchadienne indique une $[HCO_3^-]$ voisine de 11 $g.l^{-1}$ et une $[CO_3^{--}]$ de l'ordre de 5 $g.l^{-1}$. De même TALLING J.F. et I.B. (13) rapportent-ils l'abondance de Spirulina dans les eaux les plus riches en bicarbonate et carbonate.

Au laboratoire la culture de l'algue avec de faibles $[NaHCO_3]_i$ est possible à condition de régler la teneur en CO_2 du gaz de barbotage, mais il est préférable d'introduire une grosse quantité de $NaHCO_3$ au départ comme dans le M.R. pour éviter les variations rapides de pH. Dans ce cas un barbotage d'air normal est suffisant pour assurer une croissance optimale de la culture durant plusieurs jours. Généralement les milieux pour cultures d'algues, milieux le plus souvent acides ou voisins de la neutralité, sont dépourvus de bicarbonate ou de carbonate au départ et la source de C ne provient alors que du CO_2 du gaz de barbotage (33, 51 à 53). Le pourcentage de CO_2 dans l'air envoyé dans les cultures est alors compris entre 2 et 5 % (33, 54, 55), mais il atteint parfois 10 % (56, 57) et même 15 ou 20 % (58, 59). Etudiant le problème des exigences en CO_2 des cultures, DAVIS (60) a montré que la nécessité d'employer 5 % de CO_2 dans l'air pour atteindre la croissance optimale n'est pas due à une telle exigence en CO_2 de la part des algues mais découle uniquement des difficultés de diffusion du CO_2 à un niveau optimal pour chaque algue (niveau légèrement supérieur à 0,03 %).

Dans une publication de 1955, KRAUSS (61) suggère un excellent moyen de répondre aux exigences en CO_2, par la sélection d'une algue capable d'utiliser l'ion HCO_3^- aussi efficacement que le CO_2 libre. Selon l'auteur, si une telle algue pouvait être cultivée, les difficultés techniques découlant de la manipulation du CO_2 moléculaire seraient nettement diminuées ; et de tels organismes se rencontreraient parmi ceux qui montrent une croissance rapide en mi-

lieu alcalin, caractéristique de nombreuses Cyanophycées. En 1957, TAMIYA (62) souligne également les possibilités d'utilisation des HCO_3^- par certaines algues mais constate cependant qu'aucun essai de culture à grande échelle n'a été entrepris dans ce sens. Le milieu basique n'est pas exceptionnel pour les algues; bien au contraire la grande majorité des eaux du globe sont alcalines puisque constituées par les mers et océans dont le pH est généralement voisin de 8. Mais la difficulté réside dans le choix d'une algue marine microscopique poussant vite ; la rareté des algues de ce type (Porphyridium) est due principalement aux températures relativement basses des eaux marines. Par conséquent, répondant exactement aux qualités requises, la culture de Spirulina maxima pourrait constituer un exemple pratique de mise en oeuvre du CO_2 sous forme de bicarbonate.

C - La nutrition azotée.

Les problèmes de la nutrition azotée des Cyanophycées ont été abordés dès le début du siècle (63 à 65). Depuis une quinzaine d'années de nombreux travaux ont porté sur la nutrition azotée des algues (66 à 71). Toutefois, peu d'études comparatives ont été faites et à partir des résultats obtenus pour une espèce particulière il est bien difficile de tirer des généralités. Il est généralement admis que les algues chlorophylliennes, à quelques exceptions près (72, 73) utilisent très facilement les sels d'ammonium et les nitrates fournis à des doses convenables, et d'une façon beaucoup plus réduite les nitrites (74). L'urée peut également constituer une excellente source d'azote mais les cultures seraient alors plus sensibles aux températures et aux pH élevés (69).

Dans le cas de Spirulina maxima, seuls les nitrates sont assimilés quelles que soient les conditions de culture et de pH en particulier (fig. 9). Par contre les sels d'ammonium ne semblent être utilisables que si le pH est inférieur à 8,5 et que la $\left[NH_4^+\right]$ n'est pas trop élevée (tabl. VIII). Or la limite inférieure de pH assurant la croissance optimale de Spirulina est de 8 ; et de toutes façons dans cette zone étroite de pH 8 à 8,5 on note quand même un dégagement de NH_3 ; d'où la nécessité d'avoir un barbotage suffisant pour éliminer ce gaz dont l'accumulation est toxique pour les algues ; mais cette évacuation de NH_3 constitue une perte d'azote nette. L'urée est un peu mieux tolérée que les sels d'ammonium mais des précautions restent aussi à prendre à

propos du pH, du débit de barbotage et de la concentration de ce sel organique (fig. 9 et tabl. VII). En aucun cas le glycocolle ne s'est avéré utilisable par Spirulina (fig. 9). Les nitrites, contrairement aux sels de NH_4^+, ne paraissent convenir aux spirulines que si le pH augmente progressivement vers 10-11 (fig.9, tabl. VII).

Toutes ces restrictions à propos de la nutrition azotée de Spirulina maxima sont liées au milieu basique de cette algue ; il faut rappeler en effet que l'urée et les sels d'ammonium ont été utilisés, pour la plupart des cultures d'algues classiques, de chlorelles en particulier, en milieu acide. Mais les auteurs qui ont travaillé en milieu alcalin ont constaté, comme dans le cas de Spirulina, une toxicité des sels d'ammonium quand le pH augmente (71, 75, 76). Au sujet de l'urée certains admettent son absorption immédiate par l'algue sans hydrolyse préalable (29, 77), mais d'autres considèrent que l'urée est décomposée en CO_2 et NH_4OH avant d'être utilisée (78); HATTORI (79) suggère que durant l'assimilation de l'urée le carbone de la molécule est libéré sous forme de CO_2 tandis que les groupes amides se combinent avec un accepteur de telle sorte qu'il n'y ait pas formation d'ammoniac. Dans le cas de Spirulina maxima l'hydrolyse de l'urée est bien vérifiée par le dégagement de NH_3. ALGEUS (80 à 82) divise les algues en deux groupes suivant la rapidité avec laquelle elles désaminent le glycocolle ; dans le premier groupe la désamination est si rapide que l'ammoniac s'accumule dans le milieu (ce pourrait-être le cas de Spirulina maxima) ; dans le second groupe la croissance paraît limitée par la vitesse de désamination et il n'y a pas d'accumulation de NH_3. La destruction des cultures de Spirulina, dans un milieu contenant de la glycine, pourrait être due également à une prolifération anormalement élevée des bactéries en présence de l'acide aminé. Les nitrites permettent une croissance normale des cultures de Spirulina quand le pH augmente progressivement de 8,4 au-delà de 10 (fig. 9, tabl. VII) ; par contre si le pH est maintenu constant vers 8,4 la culture est inhibée. Les auteurs admettent l'utilisation des nitrites pour de nombreuses algues mais à de faibles concentrations (36, 83 à 85). La tolérance de Spirulina vis-à-vis des nitrites, en milieu très alcalin, pourrait avoir une explication chimique. En solution, l'ion NO_2^- est en équilibre avec l'acide nitreux HNO_2 suivant (86) :

$$HNO_2 \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} NO_2^- + H^+$$

Une augmentation de l'alcalinité déplacerait l'équilibre dans le sens 1 , ce qui se traduirait par une diminution de la teneur en HNO_2. Une autre équation d'équilibre peut être écrite en négligeant la fraction dissociée de l'acide azoteux (86) .

$$3\ HNO_2 \rightleftharpoons HNO_3 + 2\ NO + H_2O$$

Or en présence d'oxygène produit par la photosynthèse des algues et d'ions OH^- par augmentation du pH, on peut obtenir avec NO les réactions suivantes (87) :

$$2\ NO + O_2 \longrightarrow N_2O_4$$

$$N_2O_4 + 2\ OH^- \longrightarrow NO_2^- + NO_3^- + H_2O$$

On pourrait déduire de tout ceci que l'augmentation de l'alcalinité dans des suspensions d'algues produisant de l'oxygène par photosynthèse permet à ces algues d'utiliser les nitrites comme source d'azote; cette utilisation se faisant soit à partir des ions NO_2^- soit à partir de la forme plus oxydée NO_3^-. L'inhibition des cultures à pH constant 8,4 pourrait être due à une toxicité de l'acide nitreux HNO_2 non dissocié.

En conclusion de cette étude comparative des diverses sources d'azote seuls les nitrates conviennent à Spirulina maxima dans tous les cas de culture (entre pH 8 et 11). Les algues tolèrent des $[NaNO_3]$ de 7,5 $g.l^{-1}$; une toxicité progressive se manifeste au-delà de cette concentration (fig. 10 et 11,I). Inversement des teneurs en N trop faibles limitent la vitesse de croissance des cultures ; dans les conditions expérimentales utilisées, à partir de 130 $mg.l^{-1}$ la $[N]$ ne limite plus cette vitesse. La croissance totale des cultures est approximativement une fonction linéaire de la quantité d'azote introduite dans le milieu (fig. 11,II) ; l'ordonnée à l'origine ($[N] = 0$) n'est pas nulle à cause des traces d'azote introduites par l'inoculum ; en déduisant la valeur de cette ordonnée de la D.O. finale trouvée pour chaque $[NaNO_3]_i$ on obtient la croissance totale (Δ D.O. total) correspondant à cette $[NaNO_3]_i$ (fig. 11,II). La valeur moyenne du % d'azote dans l'algue sèche, obtenue à partir de ce graphique, est de 10 % ; elle correspond bien au résultat déterminé par l'analyse chimique.

Cette teneur en azote considérable justifie pleinement l'emploi de Spirulina maxima à des fins alimentaires par les populations du Tchad. A titre de comparaison, chez les Chlorophycées l'azote constitue généralement 6,5 à 8,5 % du poids sec (88) et pour de très nombreuses algues marines l'on signale des valeurs moyennes de 1 à 5,5 % (74).

D - Influence de K, Na et du rapport K/Na.

L'étude expérimentale fournit des preuves irréfutables de la nécessité du sodium et du potassium pour la culture de Spirulina maxima.

Si les besoins des végétaux en potassium sont qualifiés d'évidents, le sodium par contre n'a jamais été jugé indispensable à leur croissance (89) ; et l'absence de Na dans un milieu nutritif contenant suffisamment de K n'a montré aucun effet dépressif sur la croissance des plantes (90). Chez Spirulina maxima, quelle que soit la $[K]$ du milieu, la culture exempte de Na est rapidement détruite. Cette nécessité du Na constitue un caractère exceptionnel attribué aux Cyanophycées depuis très longtemps par de nombreux auteurs (26, 29, 44, 45, 91, 92, 93).

La quantité de K exigée par certaines algues peut être réduite en présence de Na mais cet élément ne peut le remplacer totalement. L'algue bleue Chroococcus a été cultivée en présence de Na avec seulement 1 p.p.m. de K dans le milieu (92). Des vitesses de croissance maximales ont été obtenus pour Anabaena et Anacystis avec 5 p.p.m. de K (29). Mais ces résultats doivent être admis en fonction de la pureté relative des sels utilisés par les auteurs. Dans le cas de Spirulina maxima (tabl. IX) une $[K]_i$ de 5 $mg.l^{-1}$ suffit à assurer la vitesse de croissance optimale mais au bout d'une journée la culture commence à ralentir jusqu'à s'arrêter totalement en moins de 3 jours (les algues présentant un net jaunissement). Pour des $[K]$ allant jusqu'à 5 $g.l^{-1}$ il n'existe pas d'influence sur la vitesse de croissance (tabl. IX) ; à des concentrations supérieures on note un ralentissement de cette vitesse (tabl. X).

Le rôle du potassium serait lié à divers processus du métabolisme algal ; une carence en cet élément produit une diminution de l'activité photosynthèse et une accélération de la respiration (94, 95) ; mais une trop forte $[K]$ peut provoquer une chlorose comme dans le cas de la carence (96).

La quantité minimale de Na exigée par Spirulina maxima, pour assurer sa croissance optimale, ne peut être déterminée dans ce cadre expérimental adapté à des cultures accélérées. En effet la [Na] étant liée à la [K] suivant un rapport K/Na dont il sera question plus loin, il faudrait introduire le potassium à des teneurs de quelques p.p.m. pour apporter ensuite des [Na] du même ordre. Pour cela les sels du M.R., en majorité des sels de Na et de K, devraient être remplacés par des sels de Ca et Mg par exemple. Mais étant donné le pH alcalin des cultures ces derniers sels ne pourraient être utilisés à des teneurs élevées à cause des précipitations.

La nécessité d'avoir un rapport K/Na convenable pour la culture de Spirulina maxima a été démontré (tabl. XII). Si le rapport est supérieur à 5 la culture est inhibée d'autant plus vite que la valeur de K/Na est plus grande. Cette influence du rapport K/Na sur la croissance des cultures pourrait s'expliquer par une toxicité de K en présence d'une [Na] insuffisante.

De même GERLOFF (97) souligne-t-il, à propos de la croissance de Microcystis aeruginosa, que des teneurs considérables de Na sont nécessaires pour contrebalancer les effets défavorables des [K] élevées. De nombreux auteurs se sont penchés sur l'influence des concentrations ioniques de K, Na, Ca, Mg et des rapports entre ces différents cations, sur la perméabilité cellulaire et les mécanismes de transport sélectif de certains ions dans la cellule (50, 98 à 102). Il semblerait que certaines algues marines exigeant une salinité élevée aient des besoins en Na très importants et indépendants des phénomènes osmotiques (102 et 103). L'absorption et la rétention de grosses quantités de Na chez de nombreuses algues impliqueraient chez ces dernières des systèmes de "pompe ionique" (100 et 101). Il faut rappeler que le milieu naturel de la souche de Spirulina contient plus de 10 $g.l^{-1}$ de Na^{+}. Il est probable que cette algue soit adaptée à l'absorption de fortes quantités de Na de la même façon que certaines algues marines.

Si beaucoup d'auteurs ont constaté une influence des variations du rapport K/Na sur la croissance des algues, par contre très peu ont essayé de déterminer avec précision la valeur optimale de ce rapport.

KRATZ et MYERS (29) soulignent que le rapport K/Na n'est pas essentiel et qu'il peut varier de 800/40 à 5/800 sans affecter la vitesse de croissance d'Anabaena cylindrica et Anacystis nidulans ZEHNDER et GORHAM (45) estiment que pour éviter l'inhibition de la croissance de Microcystis aeruginosa il faudrait un rapport K/Na $\leqslant 1$. Mais dans la littérature on ne trouve pratiquement aucune étude systématique de l'influence du rapport K/Na sur la vitesse de croissance des algues. Chez Spirulina l'inhibition de la croissance apparaît pour un K/Na > 5 ; mais la vitesse de croissance est constante si le rapport est inférieur à 5, et ce, quelles que soient les teneurs élevées de Na (18 $g.l^{-1}$, tabl. IV). Les courbes des vitesses (fig. 12) en fonction du rapport K/Na sont établies à partir des mesures faites dans l'intervalle du temps de culture 22-46 h ; dans cet intervalle l'influence des diverses valeurs de K/Na est en effet nettement discernable. Pour chacune des valeurs du rapport comprises entre 6 et 8, il semble que le processus d'inhibition de la croissance de l'algue suive une loi exponentielle (voir courbes de D.O. en fonction du temps) ; on pourrait supposer que la toxicité des ions K^+ en excès se manifeste parallèlement à un déséquilibre progressif du rapport K/Na dans la cellule algale.

E - Influence du chlore et d'autres halogènes.

Il est généralement admis que le chlore est nécessaire à la croissance de tous les végétaux (104 et 105). Il interviendrait en particulier comme coenzyme dans la photosynthèse (106, 107). Le chlore constitue le principal halogène de la majorité des algues (108) exceptions faites de celles qui sont riches en iode. Le rôle du chlore chez les algues a été signalé dans plusieurs travaux (109, 110).

L'influence de la $[Cl]$ sur la croissance des cultures de Spirulina maxima est très nette (fig. 13). Mais les aspects particuliers de ces expériences résident dans la destruction très rapide de la culture quand le chlore y est absent et dans le fait que la substitution de Cl par Br n'affecte pas la croissance des algues (tabl. XIV). Très probablement, le milieu exempt de Cl contient des traces de cet élément introduites comme impuretés des autres sels. La destruction rapide des algues en l'absence théorique de Cl ne serait donc

pas due à une carence totale en cet halogène, d'autant plus que généralement un phénomène de carence apparaît progressivement ; mais on croirait plutôt à une inhibition de la culture due à l'absence de quantités suffisantes de Cl dans le milieu. Cet élément jouerait donc au moins deux rôles distincts chez Spirulina maxima : l'un spécifique nécessitant des traces de Cl, l'autre en exigeant des teneurs relativement élevées ; mais pour ce second rôle le brome peut être substitué au chlore. Par contre l'iode ne peut remplacer ce dernier et le mélange Br + I a légèrement affecté les cultures. Certains auteurs ont déjà signalé la possibilité de suppléer Cl par Br mais non par I ou F (115).

En pratique une $[Cl]_i$ de 30 p.p.m. est suffisante pour assurer la croissance optimale de la culture, durant près de 3 jours, dans les conditions expérimentales décrites. Mais pour éviter l'apparition d'une carence en Cl il est préférable d'introduire au départ des cultures une $[Cl]$ bien plus importante. D'ailleurs la tolérance de Spirulina vis-à-vis de Cl est très grande comme l'ont montré les essais au laboratoire (tabl. IV, S_{10} ; $[KCl]$ dans fig. 12). Dans la mare du Tchad la $[Cl^-]$ est de 1000 $mg.l^{-1}$; et BEADLE (8) signalait en 1932 une $[Cl^-]$ de 3450 $mg.l^{-1}$ dans le lac Hannington particulièrement riche en algues bleues du genre Spirulina.

F - Etude des autres éléments du milieu de culture.

Les autres composants du milieu nutritif, P, S, Ca, Mg, E.D.T.A., Fe, A_5 et B_6, dans les conditions expérimentales adoptées, en particulier d'éclairement limité à 5000 lux, montrent tous un point commun : l'absence d'influence de la concentration de chacun d'entre eux sur la vitesse de croissance des cultures (fig. 14, 15 ; tabl. XV à XVIII). Par conséquent du point de vue cinétique les résultats montrent que ces paramètres nutritifs n'offrent pas de facteurs d'action. Cependant quelques remarques peuvent être tirées, pour chacun, à propos des exigences et des tolérances physiologiques de Spirulina maxima.

La nécessité de P, S et Mg est évidente, ces éléments étant indispensables à la croissance de tous les végétaux. Il faut noter cependant que la consommation de S est comparable à celle de P (fig. 14). Avec une concentration initiale de S ou P égale à 10 $mg.l^{-1}$ la carence apparaît dès le

3e jour de culture. L'exigence de quantités appréciables de S pour la culture de Spirulina est en accord avec les conditions naturelles de vie de cette algue ; dans les eaux du Tchad la $[SO_4^{--}]$ = 2980 mg.l^{-1}. Les auteurs qui ont signalé Spirulina (Arthrospira) platensis dans les lacs de l'Est africain ont constaté en même temps la richesse en sulfates du milieu naturel.

Comparées aux éléments P et S les exigences en Ca et Mg de l'algue sont plutôt faibles (fig. 15) ; les mêmes observations ont été faites pour d'autres algues (41, 84). La nécessité du calcium pour la croissance des algues n'est pas encore bien établie alors qu'il constitue un élément majeur chez les plantes supérieures (95, 97, 110). Cependant les Cyanophycées semblent exiger plus de Ca que les Chlorophycées (93). Selon certains auteurs la demande de Ca par les algues varierait quantitativement avec la formation de leurs substances pectiques (111).

Le fer intervient à des doses infimes dans la croissance de l'algue (tabl. XVI). Pour la culture de Spirulina la nutrition en Fe, Ca, Mg et P doit être envisagée en relation avec le pH. Pour diminuer les risques d'insolubilisation de ces éléments il faudrait maintenir le pH le plus bas possible (vers 8-8,5) en faisant barboter dans la culture un air enrichi de CO_2.

L'E.D.T.A. peut être utilisé jusqu'à des doses de 260 mg.l^{-1} sans risque de toxicité pour les algues (tabl. XV).

A propos des oligoéléments, ceux contenus dans B_6 peuvent être introduits largement en excès sans inhiber la croissance de l'algue (tabl. XVIII) ; par contre la solution A_5 est d'un emploi limité à cause surtout de la présence du cuivre (tabl. XVII et XIX). La nécessité du Cu pour la croissance des algues est généralement admise comme le sont ses effets toxiques au-delà de certaines concentrations (112, 113). Le sulfate de cuivre est d'ailleurs considéré comme un excellent algicide à des concentrations de 1 à quelques p.p.m. (112). La croissance de Spirulina est affectée par 15 ml.l^{-1} de A_5 dans le milieu (soit près de 1,2 p.p.m. de sulfate de cuivre) (tabl. XVII).

III - ETUDE DE LA PHOTOSYNTHESE CHEZ SPIRULINA

L'intérêt de cette étude repose essentiellement sur l'analyse des formes possibles de la source carbonée utilisées par l'algue, en même temps que sur l'influence du pH et de la [C] sur son activité photosynthétique. La mesure du quotient photosynthétique et du rendement quantique a comme but principal d'éprouver l'appareillage et la méthode d'étude employés pour Spirulina dans les conditions d'alcalinité imposées par cette algue. Les essais relatifs à l'influence de la température sur la production apparente d'oxygène chez Spirulina maxima permettent de définir les exigences thermiques de l'algue à propos de son activité photosynthétique et de les comparer à celles du processus global de sa croissance. La fraction éclairée du réacteur de photosynthèse recevant près de 60 Klux, on pourrait s'attendre à des phénomènes de photoinhibition dans la suspension d'algues mais la brièveté des essais de photosynthèse ne permet pas de les déceler.

A - Mesure du quotient photosynthétique.

La valeur trouvée pour Q_p admet une approximation, $1 \pm 0{,}05$, du même ordre que celle obtenue pour de nombreuses algues (114). On note bien (tabl. XX) que le Q_p est indépendant du milieu utilisé pour la suspension, de la durée d'illumination et des variations du pH. L'étude de la photosynthèse chez Spirulina pourra donc se faire dans des solutions contenant uniquement $NaHCO_3$, ou $NaCl + NaHCO_3$ quand la $[NaHCO_3]$ est trop faible. Le choix d'un volume de suspension relativement grand, 100 à 150 ml, permet de réduire l'importance des erreurs dans les mesures. L'avantage présenté par l'alcalinité du milieu réside dans la possibilité de mesurer très facilement l'activité photosynthétique de l'algue ; en effet pour un milieu basique déterminé il est possible d'établir une relation entre la consommation de C par l'algue et les variations de pH engendrées (116 à 118) ce qui revient à dire que la production d'O_2 peut être suivie en continu à l'aide d'un pH mètre. La méthode de dosage du bicarbonate, employée dans la mesure du Q_p de Spirulina (tabl. XX) permet seulement d'évaluer la consommation globale de C au cours de l'essai de photosynthèse.

B - Mesure du rendement quantique.

Relativement peu d'auteurs ont utilisé la méthode calorimétrique pour la détermination du rendement quantique de la photosynthèse chez les algues. MAGEE et coll. (119) ont trouvé pour des algues vertes des valeurs de γ allant de 0,049 à 0,110 ; la moyenne des expériences donnant 0,077, soit $1/\gamma$ = 13 quanta. TONNELAT (120, 121) évalua le facteur de conversion de l'énergie chez Chlorella à environ 30 % et le rendement quantique à 1/8, soit $1/\gamma$ = 12 quanta. Pour la même algue ARNOLD (122) trouva des valeurs de $1/\gamma$ de 9,2 à 20,6. On admet actuellement que l'exigence minimale pour la photosynthèse est de 8 quanta.

Les résultats obtenus pour Spirulina ne sont pas comparables aux précédents en raison des différences dans les données expérimentales (appareil utilisé, concentration en algues des suspensions, longueur d'onde et intensité de la lumière, etc.). Le rendement quantique augmente quand l'intensité lumineuse diminue et les meilleurs γ sont obtenus avec des éclairements situés au voisinage du point de compensation (19). Or chez Spirulina la valeur de γ égale à 0,043 a été obtenue avec un éclairement relativement important : lampe à vapeur de Na de 60 W, placée à 10 cm de la suspension d'algues.

Toute une étude reste à faire concernant la détermination du rendement quantique maximal et l'influence de divers facteurs sur le rendement quantique de la photosynthèse chez cette algue bleue. La méthode thermique différentielle et le montage appliqué à cette méthode semblent très bien convenir à la réalisation de cette étude. En effet, la concordance entre les mesures manométrique et calorimétrique est très satisfaisante (tabl. XXI). On peut donc appliquer, dans le cas des algues, les méthodes physico-chimiques destinées à l'étude cinétique des réactions photochimiques.

C - Influence de la température sur la photosynthèse.

L'optimum de température pour la photosynthèse de Spirulina est atteint à 40°C. On a vu antérieurement que la vitesse de croissance maximale de l'algue est obtenue dans l'intervalle des températures 33-40°C. L'existence d'un plateau (fig. 4) pour la vitesse maximale du processus global de la croissance de l'algue s'expliquerait par l'action d'un facteur limitant, en l'occurence

l'intensité lumineuse ; en effet l'influence de la température et celle de l'éclairement des cultures sont liées (123).

Par contre le rôle de la température dans la production d'oxygène a été étudié dans des conditions de saturation lumineuse ; ce qui explique la réduction du plateau des températures à un optimum situé vers 40°C (fig. 19).

Il faut rappeler que la durée des essais de photosynthèse n'a pas dépassé 90 mn ; en pratique il sera intéressant d'avoir une température de 40°C mais seulement durant la période de photosynthèse, car maintenue en permanence à cette température, durant plusieurs jours, la culture finit par péricliter. Les coefficients de température de Spirulina (Q_{10} (23-33°C) = 1,8 ; la valeur maximale, dans les limites de température choisies pour l'étude, est Q_{10} (18-28°C) = 2,3) sont du même ordre que ceux obtenus pour de nombreuses algues (123).

La valeur maximale de la vitesse apparente de photosynthèse chez Spirulina à 40°C atteint 390 $\mu l.h^{-1}.mg.a.s^{-1}$ (Brevet français, P.V.33 192). A titre de comparaison KRATZ et MYERS (48) ont obtenu pour Anacystis nidulans un maximum de 309 $\mu l.h^{-1}.mg.a.s^{-1}$ (à 39°C).

D - Influence du pH et de la source carbonée sur la photosynthèse - Rôle des ions HCO_3^- et CO_3^{--}.

Les résultats des essais concernant les relations de la nutrition carbonée avec la croissance de Spirulina montrent que la culture de cette algue peut constituer un bon exemple d'étude pour la mise en oeuvre du CO_2 sous forme de bicarbonate. On a vu en effet que la nutrition carbonée de l'algue peut être assurée à partir de sels carbonés introduits dans le milieu, par exemple $NaHCO_3$. Mais ceci ne prouve pas que l'ion HCO_3^- soit directement utilisé pour la photosynthèse, car dans le milieu de culture le bicarbonate se trouve réparti suivant plusieurs formes carbonées en équilibre entre elles :

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \rightleftharpoons CO_3^{--} + 2\ H^+$$

et le déplacement de ces équilibres dépend du pH du milieu, de la pression partielle de CO_2 dans l'atmosphère et de la température. Les plantes chlorophylliennes terrestres disposent principalement du CO_2 atmosphérique. Mais celles qui vivent dans l'eau peuvent trouver leur source de carbone sous les diverses formes citées précédemment. Il est donc impossible d'affirmer sous laquelle ou lesquelles de ces formes la source de C est utilisée par l'algue. Donc en dehors de ses aspects technologique et économique l'emploi du bicarbonate dans la culture des algues comporte un intérêt fondamental certain. De très nombreux auteurs se sont d'ailleurs penchés sur ce problème ; mais à l'heure actuelle la grande discussion sur l'utilisation possible du bicarbonate en photosynthèse demeure encore ouverte.

1) Hypothèses sur le rôle des ions HCO_3^- et CO_3^{--} en photosynthèse.

Les nombreuses phases de la controverse sont rappelées chronologiquement, de 1884 à 1956, dans la monographie de RABINOWITCH (124). L'argument principal des partisans de l'utilisation des ions HCO_3^- réside dans l'alcalinité élevée du milieu où se produit la photosynthèse. Mais les adversaires de cette théorie limitent le rôle des ions HCO_3^- à un simple effet tampon, la dissociation de ces ions en CO_2 et OH^- permettant de compenser largement les molécules de CO_2 utilisées.

Depuis 1958 ce problème connait un regain d'intérêt, lorsque STEEMANN-NIELSEN et JENSEN (125, 126) parviennent à montrer que trois souches de Chlorella pyr. sont capables d'élever le pH au-dessus de 11 quand la photosynthèse s'effectue dans une solution de 2 mmol.$KHCO_3$ à 25°C pendant 24 h. Dans ce cas les deux auteurs s'estiment obligés d'admettre que HCO_3^- est utilisé pour la photosynthèse car la [CO_2 libre] dans une telle solution à pH 11 est proche de 10^{-5} - 10^{-6} mol.l^{-1} ; or d'après EGLE et SCHENK (127) le point de compensation de CO_2 est voisin de 10^{-6} mol. Par conséquent les algues ont été capables d'utiliser HCO_3^- durant les 24 heures, au moins à un faible degré.

Selon FELFÖLDY (132) une souche de Chlorella vulgaris dans une solution de 3 mmol.$KHCO_3$ cesse de photosynthétiser après 36-50 h quand le pH atteint 9,5 ; la [CO_2 libre] est alors de 1,5 µmol., soit donc au voisinage du point de compensation de CO_2. Cependant, soumise à des [CO_2 libre] $< 1,5$ µmol., un long moment, cette algue peut s'adapter à l'utilisation de HCO_3^-. Dans ces

conditions elle peut photosynthétiser à une vitesse appréciable même quand la $[CO_2]$ est de 2.10^{-2} µmol. (133).

En 1962, HOOD et PARK (128) publient les résultats d'une étude sur l'utilisation du bicarbonate par le phytoplancton marin. Dans une première partie, les auteurs constatent l'utilisation immédiate, par Platymonas, des ions marqués H $^{14}CO_3^-$ introduits à pH 9. En effet puisque la conversion des ions HCO_3^- en molécules de CO_2 doit passer par l'étape plutôt lente de la déshydratation de H_2CO_3, on devrait donc avoir un certain décalage entre l'introduction des ions marqués et l'utilisation du CO_2. Or la consommation de ^{14}C est immédiate et progresse linéairement avec le temps tout comme le dégagement d'oxygène. Les secondes expériences de HOOD et PARK sont basées sur le principe de la loi de DALTON selon lequel "si une plante utilise activement le CO_2 moléculaire en croissant à une vitesse linéaire, l'élimination du CO_2 en le purgeant avec un gaz inerte provoque une variation de cette vitesse de croissance". Les auteurs étudient donc l'influence du passage d'un gaz inerte (N_2) ou de CO_2 non marqué (air comprimé ordinaire) sur la consommation de ^{14}C ; les algues testées sont Platymonas, Nitzschia, une chlorelle marine et Chlorella pyrénoïdosa réputée pour son peu d'affinité envers HCO_3^-. Les résultats sont très significatifs : uniquement la croissance de Chlorella pyrénoïdosa s'est trouvée modifiée.

D'après STEEMANN-NIELSEN (134) seules les algues planctoniques qui n'admettent pas un pH basique peuvent être considérées, avec une quasi certitude, comme utilisatrices exclusives de CO_2.

STRIKLAND (129) estime que les plantes aquatiques dont l'habitat naturel est un milieu alcalin ont acquis la possibilité d'utiliser HCO_3^-. Dans l'eau de mer par exemple (pH $\simeq$ 8,2), étant donnée la faible $[CO_2$ libre$]$ on pourrait s'attendre à ce que la plupart des plantes se soient adaptées à l'assimilation du bicarbonate.

En 1963, WATT et PAASCHE (130) et STEEMANN-NIELSEN (149) démontrent que les expériences présentées par HOOD et PARK ne constituent pas une preuve absolue de l'utilisation du bicarbonate par les algues marines. Par contre, de récents travaux (134, 135) prouvent que la formation des coccolithes est certainement le mécanisme permettant à Coccolithus huxleyi d'utiliser le bicarbonate en photosynthèse.

En résumé des diverses hypothèses émises, il est probable que les plantes vivant en milieu alcalin soient adaptées à l'utilisation des ions HCO_3^- pour leur photosynthèse, mais les preuves absolues en faveur de cette hypothèse sont encore insuffisantes.

En dehors des ions HCO_3^-, les ions CO_3^{--} peuvent aussi être présents dans le milieu. Mais la plupart des auteurs admettent l'invraisemblance d'une utilisation directe du carbonate en photosynthèse (67, 128). En outre des $[CO_3^{--}]$ élevées se sont montrées toxiques pour les plantes (136). D'après STEEMANN-NIELSEN (126) les membranes plasmiques seraient imperméables aux ions CO_3^{--}. Cependant FELFÖLDY (132) pense que les algues planctoniques qui sont capables d'élever le pH de leur milieu au-delà de 11 pourraient aussi utiliser les ions CO_3^{--}. Mais STEEMANN-NIELSEN (134) note qu'à pH 11 et 20°C, 17 % du CO_2 total sont encore sous la forme HCO_3^- ; et qu'à pH 11,4, la valeur la plus élevée obtenue par FELFÖLDY, la $[HCO_3^-]$ est encore de 7 %. L'auteur conclut que la consommation de CO_2 jusqu'à pH 11,4 n'est aisément possible qu'à partir des ions HCO_3^- exclusivement, mais que d'autre part il est difficile de rejeter totalement l'hypothèse d'une utilisation des ions CO_3^{--} quoique cette dernière soit plutôt improbable.

2) Rôle du pH et de la source carbonée dans la photosynthèse de Spirulina.

Il a déjà été signalé que le rôle direct du pH du milieu dans la croissance de cette algue n'est pas simple à déterminer à cause des relations liant le pH à divers autres facteurs : évolution du système acide carbonique, modification de l'absorption de certains ions, précipitation de divers éléments du milieu etc. Dans le cadre de la photosynthèse le pH peut intervenir de deux façons distinctes :

- Influençant les divers processus du métabolisme algal, le pH peut intervenir en particulier dans l'activité photosynthétique de l'algue.
- Mais de plus, le pH intervient indirectement dans la photosynthèse en déterminant la répartition des divers composants du système carboné : CO_2, H_2CO_3, HCO_3^- et CO_3^{--}. Ce second aspect sera abordé en même temps que l'influence de la source carbonée dans la photosynthèse.

a) Influence directe du pH du milieu.

A pH 11,5 les spirulines sont rapidement détruites dans tous les cas (tabl. XXVII). La limite physiologique de pH admise par ces algues se situe vers 11,4 (tabl. XXVI). Cette valeur a déjà été déterminée lors de l'étude de la croissance des cultures de Spirulina. La même limite de pH a été trouvée pour plusieurs autres algues (137). De très nombreuses espèces sont capables d'élever le pH de leur milieu au-dessus de 11 (11,8 chez Spirogyra) (138 à 140).

Pour des concentrations convenables de la source de C la production de O_2 peut atteindre sa vitesse maximale dans l'intervalle de pH de 8 à 10 (tabl. XXVII, XXX et fig.20). Par conséquent il n'existe pas un pH optimal pour la photosynthèse de Spirulina, mais un plateau défini entre les limites 8 et 10 (fig. 21). Cet intervalle de pH est relativement étroit, comparé à celui d'autres algues ; c'est ainsi que la vitesse de photosynthèse chez Chlorella est constante entre 4,6 et 8,9 dans des conditions de saturation de CO_2 et de lumière (141). Il est généralement admis que les algues, qui sont incapables d'utiliser le C autrement que sous forme de CO_2, ont une vitesse de photosynthèse indépendante du pH (126, 142, 143) ; mais chez Spirulina la vitesse de production de O_2 est liée au pH en dehors de ses limites 8 à 10.

En effet, malgré la présence d'une $[C]$ suffisante (CO_2 et HCO_3^-) l'activité photosynthétique est réduite de 10 % à pH 7,5 et de 20 % à pH 7 (tabl. XXX), et ce pour des essais dont la durée est limitée à 60 mn. Dans ces cas où la source carbonée est favorable qualitativement et quantitativement, la réduction de l'activité photosynthétique ne peut être due qu'au pH. D'autre part, dans les conditions optimales de la $[C]$, la production d'O_2 ne dépasse pas 73 % de sa valeur maximale à pH 10,5 et 35 % à pH 11 (fig. 20 et 21). Mais cette fois-ci la distinction entre le rôle du pH et celui des diverses formes du système carboné est plus difficile à réaliser.

b) Influence de la source carbonée.

Chez Spirulina la photosynthèse persiste jusqu'à consommation totale du C introduit sous la forme de $NaHCO_3$ (tabl. XXVI) ; à la suite de quoi l'absence d'échange gazeux apparent doit signifier que le CO_2 produit par la

respiration des algues est utilisé pour la photosynthèse, et que réciproquement l'O_2 dégagé par la photosynthèse est employé dans la respiration. Ce résultat confirme l'hypothèse suivant laquelle la photosynthèse ne s'arrêterait totalement que lorsque la $[CO_2]$ est réduite à zéro.

Les valeurs du rapport $\frac{\text{Production apparente de } O_2}{\text{Quantité totale de C introduite}}$, très voisines de 1, constituent une très bonne vérification du quotient photosynthétique.

D'autre part ces résultats (tabl. XXVI) pourraient être interprétés comme arguments pour l'utilisation des ions carbonés dans la photosynthèse de Spirulina ; en effet de pH 8,3 à 11,4 tout le carbone introduit dans le réacteur est utilisé par les algues ; or à pH 11,4 le milieu contient essentiellement des ions CO_3^{--} (93 %) et HCO_3^- (7 %). Il est difficile d'affirmer que le carbonate est utilisé par les algues directement (134) ; mais son intervention indirecte, par reconstitution des ions HCO_3^- consommés, est plus probable. RABINOWITCH (144) rapporte les hypothèses de RUTTNER et ÖSTERLIND selon lesquelles certaines algues pouvant élever le pH de leur milieu au-dessus de 10 ou 11 sont capables d'utiliser les ions HCO_3^- si efficacement que la présence d'une concentration minimale de CO_2 libre n'est pas nécessaire pour assurer leur photosynthèse. Ces hypothèses s'appliquent bien à Spirulina.

Mais le rôle des ions HCO_3^- et CO_3^{--} semble évoluer en fonction de la valeur du pH de la suspension (fig. 20, tabl.XXVII, XXVIII, XXX).

A pH 8,5 la photosynthèse maximale est atteinte quand $[C]$ = 3 à 4mmol.l^{-1} (tabl. XXVIII). Or à ce pH et à 40°C la proportion de CO_2 libre dans une solution contenant 3 à 4 mmol.l^{-1} de $NaHCO_3$ est voisine de 0,5 % du C total soit une $[CO_2] \simeq 1,5$ à 2.10^{-5} mol.l^{-1}.

RABINOWITCH (144) note que la $[CO_2]$ saturante pour la photosynthèse peut varier de $0,5.10^{-5}$ à 40.10^{-5} mol.l^{-1}. Dans le cas de Spirulina il est possible d'émettre deux hypothèses à propos des formes carbonées utilisées :

ou bien la $[C]$ nécessaire à la vitesse maximale de photosynthèse est de l'ordre de 1,5 à 2.10^{-5} mol.l^{-1}, auquel cas la $[CO_2]$ du milieu est suffisante pour assurer la saturation de la photosynthèse.

Mais alors l'utilisation des HCO_3^- n'est pas du tout évidente ;

- ou bien la concentration saturante est $> 2.10^{-5}$ mol.l^{-1}, ce qui nécessiterait l'emploi des ions HCO_3^- dans la photosynthèse.

Jusqu'à pH 9 la [C] de 0,01 à 0,5 mol.l^{-1} n'a pas d'influence sur la vitesse de photosynthèse de l'algue (fig. 20). Or de pH 8,5 à pH 9 le carbone est essentiellement à l'état d'ion HCO_3^- (97 à 94 %) ; par conséquent entre 10 et 500 mmol.l^{-1} la $[HCO_3^-]$ n'a aucune influence sur la vitesse de photosynthèse de Spirulina.

Mais au-delà de pH 9 l'intervalle des concentrations saturantes de C tend à se réduire pour atteindre à pH 10 le voisinage de 0,2 mol.l^{-1}.

A pH 9,5 la production d'O_2 maximale (environ 15 μmol.h^{-1}.mg.a.s^{-1}) est atteinte dans l'intervalle des [C] de 0,05 à 0,4 mol.l^{-1} ; dans cet intervalle la $[HCO_3^-]$, soit près de 86 % du carbone total, va de 43 à 344 mmol.l^{-1}. Or à pH 8,5 une $[HCO_3^-]$ de 10 mmol.l^{-1} suffit à assurer la saturation de la photosynthèse ; d'où deux explications sont possibles à pH 9,5 :

- ou bien l'algue n'utilise que le CO_2 moléculaire et la trop faible concentration de ce dernier ne permet pas une photosynthèse maximale ;
- ou bien la perméabilité des cellules aux ions HCO_3^- à pH 9,5 n'est plus la même qu'à pH 8,5 ; et une $[HCO_3^-] \geqslant 43$ mmol.l^{-1} devient nécessaire pour assurer la saturation de la photosynthèse. L'absorption du bicarbonate chez Spirulina pourrait se faire selon un mode de "diffusion passive" c'est-à-dire à une vitesse dépendant de la $[HCO_3^-]$ (145, 146).

La réduction de la photosynthèse à pH 9,5 quand la [C] dépasse 0,4 mol.l^{-1} pourrait être due à une toxicité des ions CO_3^{--} se trouvant à une concentration supérieure à 56 mmol.l^{-1}.

A pH 10, la vitesse maximale de photosynthèse correspond à une [C] de 0,2 mol.l^{-1}, ce carbone étant approximativement réparti en 132 mmol.l^{-1} de HCO_3^- et 68 de CO_3^{--}.

Mais à ce pH la concentration de CO_2 libre dans la suspension est considérée comme nulle (22) ; et même si des traces de CO_2 persistaient encore elles ne suffiraient pas, cependant, à assurer la saturation de la photosynthèse. Par conséquent cette vitesse maximale de production de O_2 ne peut être atteinte à pH 10 qu'avec la participation des ions HCO_3^-. L'équation globale de la photosynthèse chez Spirulina pourrait alors s'écrire :

$$HCO_3^- + 2\ H_2O + h\nu \xrightarrow[\text{algues}]{} \{CH_2O\} + H_2O + O_2 + OH^-$$

Suivant un mécanisme déjà cité (142) l'ion HCO_3^- se dissocierait au niveau de la cellule algale en CO_2 nécessaire à la photosynthèse et OH^- libéré dans le milieu. La réduction de l'activité photosynthétique, à pH 10, de part et d'autre de la $[C]$ optimale égale à 0,2 mol.l^{-1}, peut s'expliquer de la même façon qu'à pH 9,5 ; c'est-à-dire par une $[HCO_3^-]$ insuffisante quand la $[C]$ est inférieure à 0,2 mol.l^{-1} et par une toxicité des ions CO_3^{--} quand la $[C]$ est supérieure à 0,2 mol.l^{-1}.

A pH 10,5 la photosynthèse atteint tout au plus 73 % de sa vitesse maximale. Cette limitation peut s'expliquer de plusieurs façons : soit par une action directe du pH sur la physiologie de l'algue, soit par l'influence des ions HCO_3^- et CO_3^{--}. Dans un certain domaine les deux hypothèses seraient complémentaires en ce sens que l'élévation du pH modifierait la perméabilité des membranes cellulaires aux ions carbonés.

La courbe (fig. 20) présente un minimum à 0,1 mol.l^{-1} qui devrait s'expliquer par le chevauchement de deux processus distincts. Ces derniers pourraient correspondre aux rôles antagonistes des ions HCO_3^- et CO_3^{--}. A 0,05 comme à 0,2 mol.l^{-1} de C (fig. 20) l'influence de la $[HCO_3^-]$ dominerait l'action inhibitrice des ions CO_3^{--} ; mais à 0,1 mol.l^{-1} de C la $[HCO_3^-]$ serait insuffisante pour limiter l'influence des ions CO_3^{--}. Pour admettre cette explication il faut supposer que les rôles des concentrations absolues de HCO_3^- et CO_3^{--} sur la photosynthèse ne suivent pas les mêmes lois. Donc 64 mmol.l^{-1} de CO_3^{--} (quand $[C]$ = 0,1 mol.l^{-1}) agiraient plus efficacement en présence de 36 mmol.l^{-1} de HCO_3^-, que 128 mmol. de CO_3^{--} ne le feraient en présence de 72 mmol. de HCO_3^- (quand $[C]$ = 0,2 mol.l^{-1}). Pour des valeurs de $[C]$ supérieures à 0,2 mol.l^{-1}, la vitesse de photosynthèse diminue avec

l'augmentation de la quantité absolue d'ions CO_3^{--}.

A pH 11 la photosynthèse optimale est réduite à 35 % de son intensité maximale et la courbe (fig. 20) rappelle encore un peu la forme particulière obtenue à pH 10,5. Les explications précédentes s'appliqueraient aussi bien aux résultats obtenus à pH 11. La destruction des algues à pH 10,5 et 11 en présence des fortes $[C]$, 0,4 et 0,5 $mol.l^{-1}$, même quand les suspensions sont placées dans l'obscurité, semblent prouver la toxicité des ions CO_3^{--} à des concentrations élevées.

Pour résumer le rôle du pH et de la source carbonée dans l'activité photosynthétique de Spirulina on peut dire qu'entre ses limites 8 et 10, le pH n'a aucune influence directe sur la vitesse de photosynthèse de cette algue (fig. 21,I) et que la $[C]$ saturante peut être atteinte à partir de 3 à 4 $mmol.l^{-1}$ (fig. 21,II). Si la discussion précédente n'apporte pas de preuves décisives de l'assimilation des ions HCO_3^- en photosynthèse, on peut cependant y discerner de nombreux indices en faveur d'une telle assimilation.

C O N C L U S I O N

Cette étude constitue en fait le premier travail fondamental effectué sur l'algue bleue Spirulina maxima. Par l'application systématique des méthodes physicochimiques conventionnelles de l'étude cinétique des réactions et des réactions photochimiques en particulier, elle apporte une description qualitative, pseudoquantitative et parfois quantitative de la croissance des cultures et de la réaction de photosynthèse de cette cyanophycée. Ce travail permet ainsi la détermination des conditions optimales de culture, qui recoupent du reste des résultats expérimentaux obtenus à plus grande échelle, et apporte de plus une contribution aux résultats relativement peu nombreux des études de la photosynthèse en milieu alcalin.

Les principales caractéristiques physiologiques de la souche tchadienne de Spirulina maxima sont donc l'exigence d'un milieu alcalin et la thermophilie : la croissance des cultures est en effet possible à des pH compris entre 8 et 11 et sa vitesse maximale est atteinte à des températures voisines de 35°C. Les conditions de la croissance optimale de l'algue en fonction de divers paramètres nutritifs ont été déterminées. Etant donné les conditions d'alcalinité imposées par la culture, les nitrates constituent la seule source d'azote utilisable en toutes circonstances. La présence de Na est indispensable dans la culture de Spirulina maxima et la vitesse de croissance maximale de cette algue n'est obtenue que si le rapport K/Na est inférieur ou égal à 5. La teneur en chlore influence nettement la croissance des algues mais le brome semble pouvoir être substitué presque entièrement à Cl dans la culture. Avec l'éclairement limitant utilisé, en dehors de N, K/Na et Cl, tous les autres facteurs nutritifs étudiés n'ont pas montré d'influence sur la vitesse de croissance des cultures. Dans les conditions optimales d'expérience au laboratoire on a atteint une vitesse de croissance maximale de 840 mg.a.s.l^{-1}.J^{-1} et un temps de génération minimal d'environ 7 h.

Outre l'intérêt nutritif qu'elle présente, Spirulina maxima constitue un exemple de choix pour des études futures sur le plan scientifique. Les caractéristiques physiologiques de cette algue et tout particulièrement son

adaptation à des milieux très alcalins offrent en effet des possibilités d'études très intéressantes en physiologie végétale et plus précisément sur la photosynthèse en milieu basique. Certains aspects de cette dernière ont été abordés dans ce travail. La méthode alcalimétrique utilisée pour la vérification du quotient photosynthétique a permis de trouver une valeur unitaire de ce dernier avec une précision de 5 % en valeur relative. L'application d'une méthode thermique différentielle pour la détermination du rendement quantique a fourni des résultats comparables à ceux de la méthode manométrique couramment utilisée. Dans les limites de pH admises par cette algue, la photosynthèse a été envisagée par rapport aux diverses formes de la source carbonée ; bien que les preuves définitives soient difficiles à établir, il a été possible d'apporter un certain nombre d'arguments tendant à prouver qu'à des pH élevés, voisins de 10 ou 11, l'algue utilise directement le CO_2 sous la forme ionique HCO_3^-. Quel que soit le mécanisme de la fixation du CO_2 chez Spirulina maxima la culture de cette algue constitue un exemple particulièrement significatif de mise en oeuvre du CO_2 sous forme de bicarbonates et de carbonates ; et il en résulte en particulier que les difficultés techniques inhérentes à la manipulation du CO_2 moléculaire dans les cultures d'autres espèces d'algues sont nettement aplanies dans le cas des spirulines ou de tout autre espèce d'algue vivant en milieu basique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1 - BRANDILY M.Y. (1959)
Sciences et Avenir n° 152, 516-19.

2 - GEITLER L (1932)
Kryptogamen-Flora, Cyanophyceae von Europa, 14
Akademische Verlagsgesellschaft - Leipzig.

3 - CHADEFAUD M. et EMBERGER L. (1960)
Traité de Botanique Systématique, Tome I, p. 37, MASSON éd.

4 - JENKIN P.M.
(1929) Nature 124, 574 ; (1936) Ann. Mag. nat. Hist. 18, 133-81.

5 - RICH F. (1932)
Trans. Roy. Soc. S. Afr 10.

6 - RICH F. (1932)
Ann. Mag. nat. Hist. 10, 57, 233-62.

7 - RICH F. (1932)
Jour. Lin. Soc. Lond. Zool. 38, 249-75.

8 - BEADLE L.C. (1932)
Jour. Lin. Soc. Lond. Zool. 38, 157-211.

9 - LOFFREDO S. et MALDURA C.M. (1941)
Collez. Scient. e Doc. dell'Afr. ital. III, vol.I, 181-200.

10 - DAMAS H. (1955)
Mem. Acad.Sci.Colon. belge, cl.sci. nat. n.s., 13, 1-66.

11 - RICH F. (1931)
Revue algologique, 6, 75-79.

12 - WEST W. et WEST G.S. (1896)
Journal of Bot. 34, p. 377 et tab. 361.

13 - TALLING J.F. et TALLING I.B. (1965)
Int. Rev. Ges. Hydrob. 50, 3, 421-63.

14 - LEONARD J. (1966)
Nature, 209, 126-27.

15 - ARNON D.I. (1958)
Amer. Jour. Bot. 25, 322-25.

16 - MYERS J. (1962)
Dans "Physiol. and Biochem. of Algae" chap. 39, 603-15
LEWIN R.A. ed. Acad. Press.

17 - MOYSE A. (1956)
Ann. Biol., 32, Fasc. 3-4, 101-28.

18 - CHARLOT G. (1961)
Les méthodes de la chimie analytique - Analyse quantitative minérale - chap. 12 p. 665, Masson éd.

19 - RABINOWITCH E.I. (1951)
Photosynthesis and Related Processes. Vol. II, part. 1, chap. 29, p. 1083. Interscience publ. INC.

20 - BAUMGARTNER P. et DUHAUT P. (1960)
Bull. Soc. Chim., 1187-92

21 - BAUMGARTNER P., DESCHAMPS A., ZARROUK C. (1966)
Bull. Soc. Chim. (à paraître).

22 - RILEY U.P. et SKIRROW G. (1965)
Chemical Oceanography. Vol. I, 652-59 - Acad. Press.

23 - ROUND F.E. (1965)
The Biology of Algae p. 62. Edward Arnold (Pub.)

24 - RUTTNER F. (1952)
Fundamentals of Limnology. Univ. Toronto Press.

25 - BUCK K. (1960)
Konstituenten der kohlendioxyd - carbonatlösungen ün gleichgewicht.Ruhland-Pirson p. 7.

26 - FOGG G.E. (1956)
Bact. Rev. 20, 148-65.

27 - BÜNNING E., et HERDTLE H. (1946)
Z. Naturforsch, 1, 93-99.

28 - GESSNER F. (1955)
Hydrobotanik. Band I. Energiehaushalt
Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.

29 - KRATZ W.A. et MYERS J. (1955)
Amer. J. Bot., 42, 282-87.

30 - MOYSE A., COUDERC D. et GARNIER J. (1957)
Rev. Cytol. Biol. vég. 18, 293-304.

31 - MARRE E. (1962)
Dans "Physiol. and Biochem. of Algae" chap. 33, 541-50
Lewin R.A. éd. Acad. Press.

32 - MONOD J. (1958)
Recherches sur la croissance des cultures bactériennes - Thèse 1942, p. 106-15 - 2ème éd. HERMANN.

33 - MOYSE A. (1956)
Ann. Biol., 32, Fasc. 3-4, 101-28

34 - GUILLARD R.R.L. (1962)
Dans "Physiol. and Biochem. of Algae" chap. 32, 529-40
Lewin R.A. éd. Acad. Press.

35 - CHAPMAN V.J. (1962)
The Algae - chap. XV, p. 404, London. McMillan et Co.

36 - SYRETT P.J. (1962)
Dans "Physiol. and Biochem. of Algae" chap. 10, 171-88
Lewin R.A. éd. Acad. Press.

37 - MOLISCH H. (1896)
Sitzber. Akad. Wiss. Wien. math. naturwiss KLL 104, 783.

38 - MAERTENS H. (1914)
Beitr. Biol. Pflanz. 12, 439.

39 - PEARSALL W.H. (1932)
J. Ecol. 20, 241-62.

40 - GERLOFF G.C., FITZGERALD G.P. et SKOOG F. (1950)
Am. J. Bot. 37 (3), 216-18.

41 - GERLOFF G.C., FITZGERALD G.P. et SKOOG F. (1950)
Am. J. Bot. 37, 835-40.

42 - BAAS BECKING L.G.M. et WOOD E.J.F. (1955)
Proc. Acad. Sci. Amsterdam B. 58, 160-81.

43 - LUND J.W.G. (1962)
Dans "Physiol. and Biochem. of Algae" chap. 51, 759-70
Lewin R.A. éd. Acad. Press.

44 - ALLEN M.B. (1952)
Arch. Mikrobiol. 17, 34-53.

45 - ZEHNDER A. et GORHAM P.R. (1960)
Can. J. Microb. 6, 646-60.

46 - GIBBS M. (1962)
Dans "Physiol. and Biochem. of Algae" chap. 4, p. 62
Lewin R.A. éd. Acad. Press.

47 - OUELLET C. et BENSON A.A. (1952)
J. Exptl. Bot. 3, 237-45.

48 - KRATZ W.A. et MYERS J. (1955)
Plant. physiol. 30, 275-80.

49 - BURKHOLDER P.R. (1934)
Quart. Rev. Biol. 9, 438-59.

50 - STADELMANN E.J. (1962)
Dans "Physiol. and Biochem. of Algae" 493-528
Lewin R.A. éd. Acad. Press.

51 - KRAUSS R.W. (1961)
Dans "Algal culture from laboratory to pilot plant" chap. 8, 85-102. Carn. Inst. Wash. Pub. 600.

52 - KANAZAWA T., FUJITA C., YUHARAT et SASA T. (1958)
J. Gen. Appl. Microb. 4, 3, 135-52.

53 - KAPPANA A.N., THIVY F. et IYENGAR E.R.R. (1964)
Rev. Algol. VII, 2, 192-95.

54 - WATANABE A., HATTORI A., FUJITA Y. et KIYOHARA T. (1959)
J. Gen. Appl. Microb. 5, 1-2, 51-57.

55 - MYERS J., PHILLIPS J.N. Jr et GRAHAM Jo. R. (1951)
Plant. Physiol. 539-48.

56 - KRAUSS R.W. (1955)
Nutritional requirements and Yields of Algae in mass culture
Presented at the Conf. Solar Energy "The Scientific Basis" - Tucson Arizona oct. 31 - nov. 1.

57 - DAVIS E.A., DEDRICK J., FRENCH C.S., MILNER H.W., MYERS J., SMITH H.H. et SPOEHR H.A. (1953)
Carnegie Inst. Wash. Publ. n° 600, 105-53.

58 - ANSELL A.D., RAYMONT J.E.G., LANDER K.F., CROWLEY E. et SHACKLEY P. (1963)
Limnology and Oceanography - IV, vol. 8 n° 2, 184-213.

59 - GEOGHEGAN M.J. (1953)
Carnegie Inst. Wash. Publ. n° 600, 182-89.

60 - DAVIS E.A. (1952)
Carnegie Inst. Wash. Yearbook, 51, 135.

61 - KRAUSS R.W. (1955)
Scientific monthly, 21-28.

62 - TAMIYA H. (1957)
Ann. Rev. Pl. Physiol. 8, 309-34.

63 - PRINGSHEIM E.G. (1913)
Beitr. Biol. Pflanz. 12, 49.

64 - GLADE R. (1913)
Beitr. Biol. Pflanz. 12, 295.

65 - MAERTENS H. (1914)
Beitr. Biol. Pflanz. 12, 439.

66 - MYERS J. (1951)
Ann. Rev. Microbiol. 5, 157-80.

67 - FOGG G.E. (1953)
The Metabolism of Algae, METHUEN and Co LTD. London.

68 - SYRETT P.J. (1954)
Symposium Soc. Gen. Microbiol. n° 4, 126-51.

69 - MOYSE A. (1956)
Revue Générale de Botanique, 63, p. 167.

70 - KESSLER E. (1959)
Symposia Soc. Exptl. Biol. n° 13, 87-105.

71 - STEWART W.D.P. (1963)
Jour. Exp. Bot. 15, n° 43, 138-45.

72 - CRAMER M. et MYERS J. (1952)
Arch. Mikrobiol. 17, 384-402.

73 - PROVASOLI L. (1958)
Ann. Rev. Microbiol. 12, 279.

74 - ROUND F.E. (1965)
The Biology of Algae, p. 150. Edward Arnold (Pub.).

75 - CLARK H.E. et SHIVE J.W. (1934)
Soil Science 37, 203-25.

76 - WARREN K.S. (1962)
Nature 195, 47-49.

77 - WALKER J.B. (1952)
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 38, 561-66.

78 - ALLISON R.K., SKIPPER H.E., REID M.R., SHORT W.A. et HOGAN G.L. (1954)
Plant Physiol. 29, 164-68.

79 - HATTORI A. (1960)
Plant and cell physiol. 1, 107-16.

80 - ALGEUS S. (1948 a)
Physiol. plant. 1, 66-84.

81 - ALGEUS S. (1948 b)
Physiol. plant. 1, 236-44.

82 - ALGEUS S. (1948 c)
Physiol. plant. 1, 382-83.

83 - FOGG G.E. et WOLFE M. (1954)
Symp. Soc. Gen. Microbiol. 4, 99-125.

84 - GERLOFF G.C., FITZGERALD G.P. et SKOOG F. (1952)
Am. J. Bot. 39, 26-32.

85 - ZOBELL C.E. (1935)
Proc. Natl. Acad. Sci. 21, 517-22.

86 - PASCAL P. (1956)
Nouveau traité de chimie minérale, Tome X, 412-44- Masson éd.

87 - CHARLOT G. (1961)
Les méthodes de la chimie analytique p. 617. Masson éd.

88 - KETCHUM B.H. (1954)
Ann. Rev. Pl. physiol. 5, 55-74.

89 - ARNON D.I. (1952)
Dans "Minéral nutrition of plants", 313-41. TRUOG E. éd.
Univ. of Wisconsin Press., Madison Wis.

90 - BEAR F.E. (1953)
Soil Science 76, 1.

91 - BENECKE W. (1898)
Bot. Zeit. 56, 83.

92 - EMERSON R. et LEWIS C.M. (1942)
J. Gen. Physiol. 25, 579-95

93 - ALLEN M.B. et ARNON D.I. (1955)
Physiol. plant. 8, 653-60.

94 - OZBUN J.L. (1964)
Effect of light and K nutrition on Photosynthesis and Respiration. Thesis - Univers. North Carolina state, Raleigh.

95 - GAUCH H.G. (1957)
Ann. Rev. Pl. physiol. 8, 31-63.

96 - RABINOWITCH E.I. (1945)
Photos.and rel. proc. Vol.I, chap. 15, 339-437. Inters. Pub.

97 - GERLOFF G.C. (1963)
Ann. Rev. Pl. Physiol. 14, 107-24.

98 - SCOTT G.T. et HAYWARD H.R. (1955)
Dans "Electrolytes in Biological system". SHANES A.M. éd.,
35-64, Am. Physiol. Soc., Washington D.C.

99 - EPPLEY R.W. (1958)
J. Gen. Physiol. 41, 5, 901-11.

100 - EPPLEY R.W. et CYRUS C.C. (1960)
Biol. Bull. 118, 55-65.

101 - EPPLEY R.W. (1962)
Dans "Physiol. and Biochem. of Algae" chap. 16, 255-266
Lewin R.A. éd. Academ. Press.

102 - DROOP M.R. (1958)
Verhandl. intern. Ver. Limnol. 13, 722-30

103 - Mc LACHLAN J. (1960)
Can. J. Microbiol. 6, 367-79.

104 - ULRICH A. et OHKI K. (1956)
Plant. physiol. 31, 171-81.

105 - JOHNSON C.M., STOUT P.R., BROYER T.C. et CARLTON A.B. (1957)
Plant. and Soil 8, 337.

106 - ARNON D.I. et WHATLEY F.R. (1949)
Science. 110, 554-56.

107 - ARNON D.I. (1959)
Nature 184, 10-21.

108 - VINOGRADOV A.P. (1953)
"The elementary chemical composition of marine organisms"
Sears Foundation for Marine Research, Memoir II, New Haven, Connecticut.

109 - EYSTER C. (1958)
Nature 181, 1141-42.

110 - LUND J.W.G. (1965)
Biological Reviews, 40, n° 2, 231-93.

111 - O'KELLY J.C. et HERNDON W.R. (1961)
Am. J. Bot. 48, 796.

112 - ROUND F.E. (1965)
The Biology of Algae p. 154 et 222. E. ARNOLD (Pub.).

113 - WIESSNER W. (1962)
Dans "Physiol. and Biochem. of Algae" - chap. 17, 267-86
Lewin R.A. éd. Acad. Press.

114 - RABINOWITCH E.I. (1945)
Photos. and rel. proc. Vol.I p.33, intersc. Pub. INC.

115 - EYSTER C. (1964)
Dans "Algae and Man", 86-119. D.F. JAKSON éd. Plenum Press.

116 - ROSENBERG J.L. (1953-54)
J. Gen. Physiol. n° 37, 753-74.

117 - LINDAHL P.E.B. (1963)
Symbol. Bot. Upsal. 17, 4, 47 p.

118 - VERDUIN J. (1964)
Dans "Algae and Man" p. 222. D.F. JAKSON éd. Plenum Press.

119 - MAGEE J.L., De WITT T.W., SMITH E.C., DANIEL S.F. (1939)
J. Am. Chem. Soc. 61, 3529-33.

120 - TONNELAT J. (1944)
C.R. Acad. Sc. 218, p. 430.

121 - TONNELAT J. (1946)
Thèse, Paris, série A n° 2092.

122 - ARNOLD W. (1949)
Dans "Photosynthesis in plants", 273-76, IOWA St. Col. Press, Ames, Ia

123 - RABINOWITCH E.I. (1956)
Photos. and rel. proc. II,2, chap. 31, 1211-254. Intersc. Pub. INC.

124 - RABINOWITCH E.I.
Photos. and rel. proc. Interscience Publish. INC.
1945. Vol. I , 195-200
1951. Vol. II, part. 1, 886-91
1956. Vol. II, part. 2, 1886-92.

125 - STEEMANN NIELSEN E. et JENSEN P.K. (1958)
Physiol. plant. 17, 170-80.

126 - STEEMANN NIELSEN E. (1960)
Dans "Handb. pflanzenphysiol" V_1 , 70-84. éd. RUHLAND W. Springer Verl., Berlin.

127 - EGLE K et SCHENK W. (1952).
Beitr. Biol. Pflanz. 29, 75-105.

128 - HOOD D.W. et PARK K. (1962)
Physiol. plant. 15, 273-82.

129 - STRICKLAND J.D.H. (1960)
Fish. Res. Bd. Canada Bull. n° 122.

130 - WATT W.D. et PAASCHE E. (1963)
Physiol. plant. 16, 674-81.

131 - STEEMANN NIELSEN E. (1963)
Physiol. plant. 16, 466-69.

132 - FELFÖLDY L.J.M. (1960a)
Acta. Biol. Acad. Scient. Hung. 11, 67-75.

133 - FELFÖLDY L.J.M. (1960b)
Acta. Biol. Acad. Scient. Hung. 11, 175-85.

134 - STEEMANN NIELSEN E. (1966)
Physiol. plant. 19, 232-40.

135 - PAASCHE E. (1964)
Physiol. Plant. suppl. 3, 1-82.

136 - ÖSTERLIND S. (1949)
Symbol. Botan. Upsal. 10, 3, 1-141.

137 - FELFÖLDY L.J.M. (1965)
Acta. Biol. Hung. 15 (3). 351-59.

138 - SHUTOV D.A. (1926)
Planta 2, 132.

139 - BODE H.R. (1926)
Jahr. Wiss. Botanik 65, 352.

140 - DAHM P. (1926)
Jahr. Wiss. Botanik 65, 314.

141 - EMERSON R. et GREEN L. (1938)
Plant. physiol. 13, 157-68.

142 - STEEMANN-NIELSEN E. (1955)
Physiol. plant. 8, 106-15.

143 - RUTTNER F. (1960)
Schweiz. Z. Hydrol. 22, 280-91.

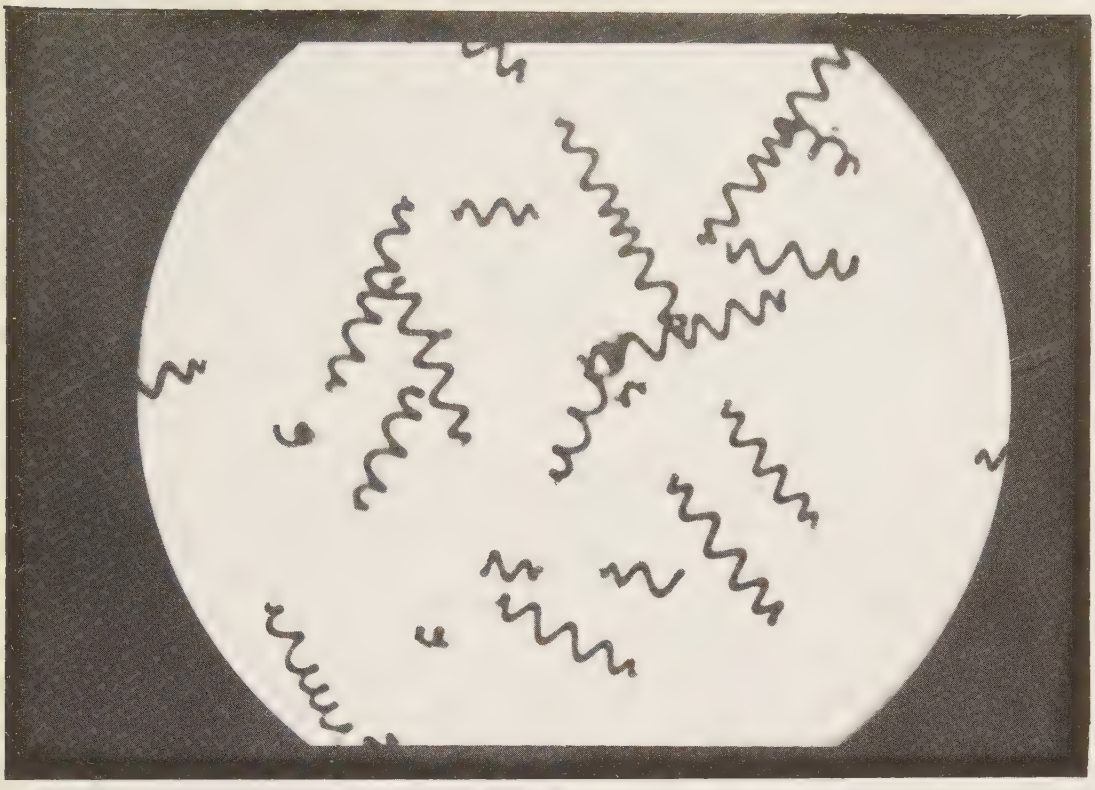
144 - RABINOWITCH E.I. (1951)
Dans "Photos. and rel. proc." 891-901. Intersc. publ. INC.

145 - STEEMANN NIELSEN E. (1951)
Physiol. plant. 4, 189.

146 - STEEMANN NIELSEN E. (1952)
Physiol. plant. 5, 145.

147 - BRIANTAIS J.M. (1963)
Physio. vég. 1, 4, 283-314.

Spirulines grossies 115 fois



Spiruline grossie 360 fois

La longueur de l'algue est de 250 microns

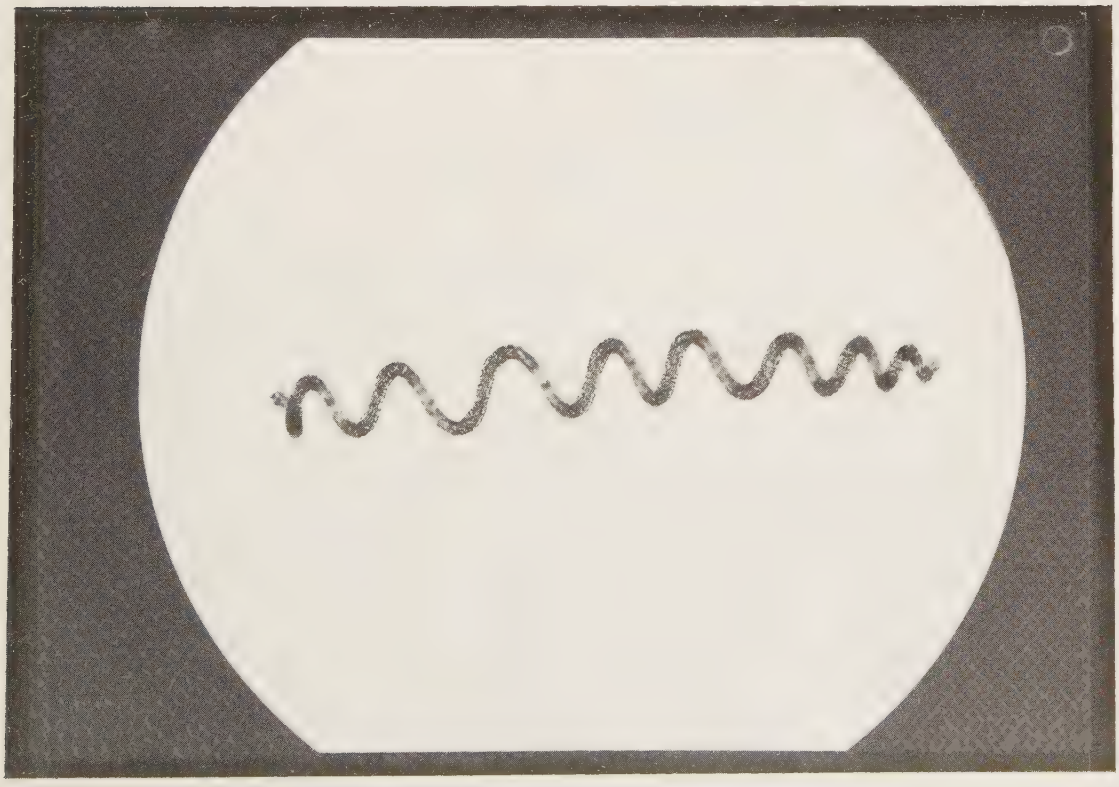


PHOTO 1 - SPIRULINA MAXIMA

PHOTO 2 - APPAREIL POUR L'ETUDE DES CULTURES D'ALGUES

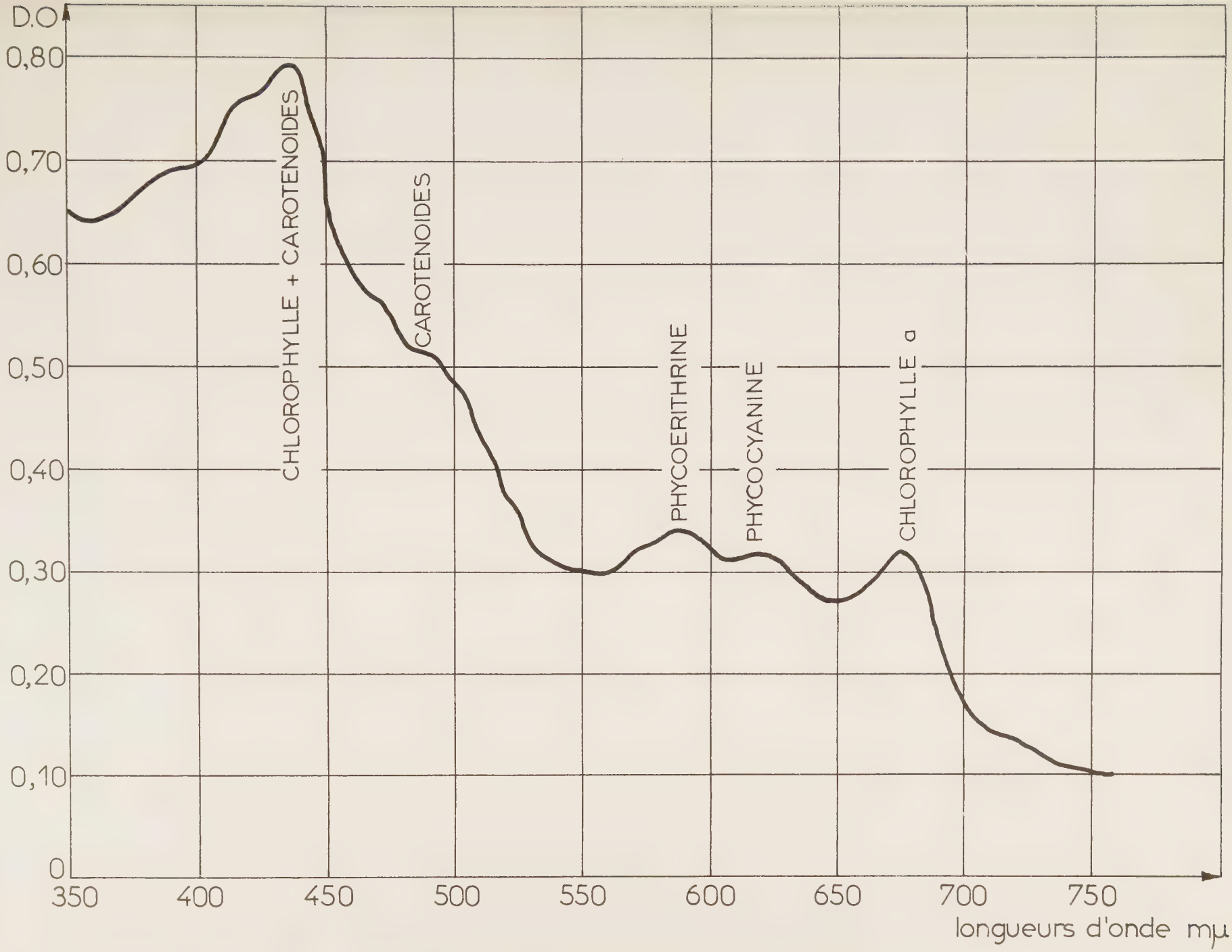


Fig. 1 - Spectre d'absorption d'une suspension de Spirulines dans leur milieu de culture

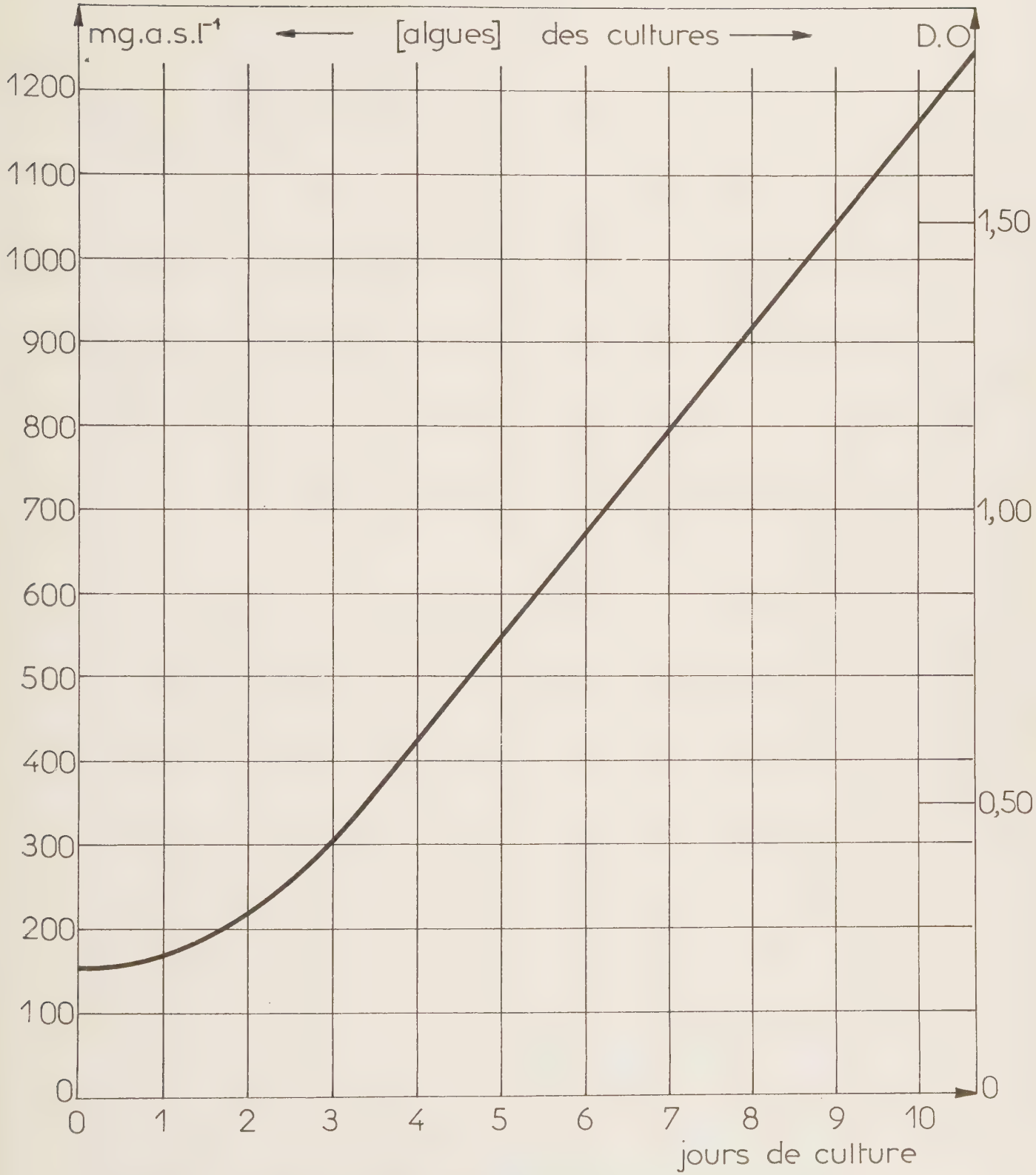
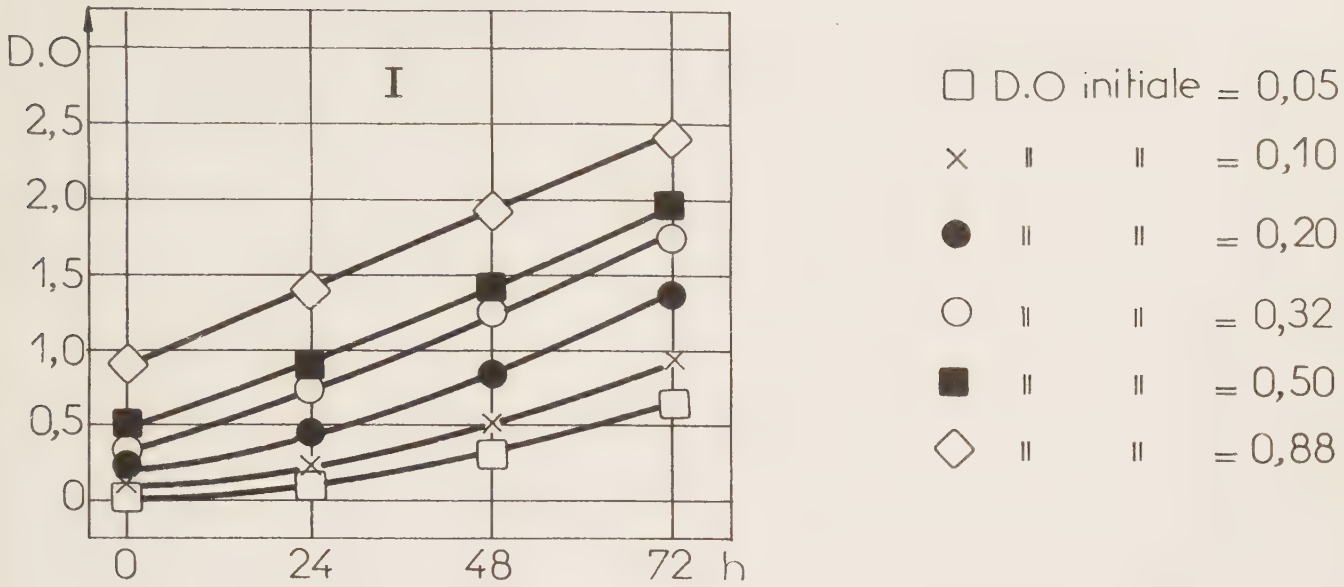
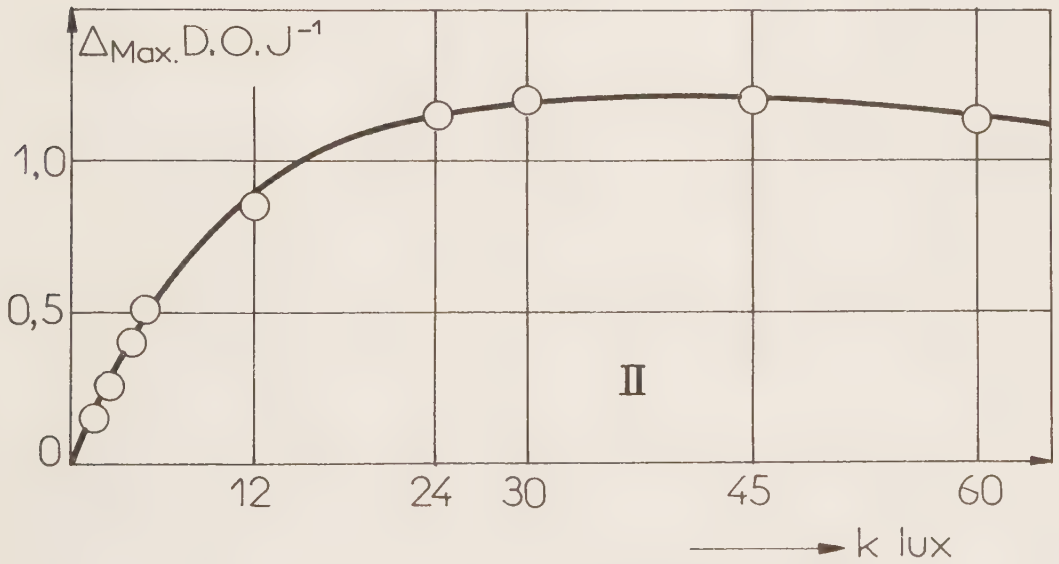


Fig. 2 - Courbe de croissance d'une culture de Spirulina maxima.
Culture en flacon de Roux à 32°C, sous 3.000 lux
Barbotage d'air normal - 60 $l.h^{-1}.l^{-1}$



COURBE DE CROISSANCE A DIVERSES D.Oi
T = 33°C – 5000 lux



INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT
SUR LA VITESSE DE CROISSANCE MAXIMUM A 33°C

Fig. 3 - Influence de l'éclairement sur la croissance des cultures de Spirulina en relation avec la concentration initiale en algues

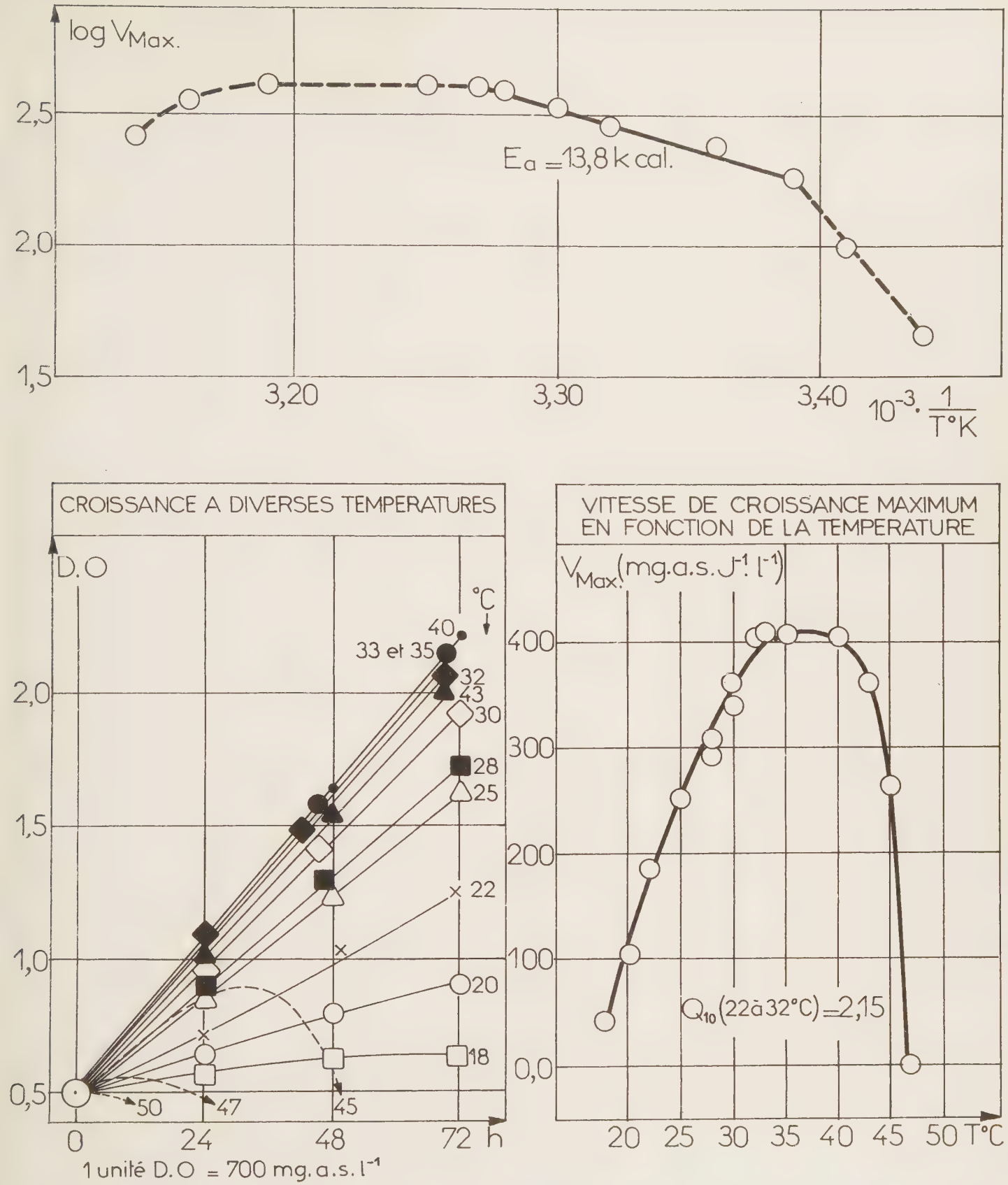


Fig. 4 - Influence de la température sur la vitesse de croissance des cultures de Spirulina

Eclairement 6.000 lux

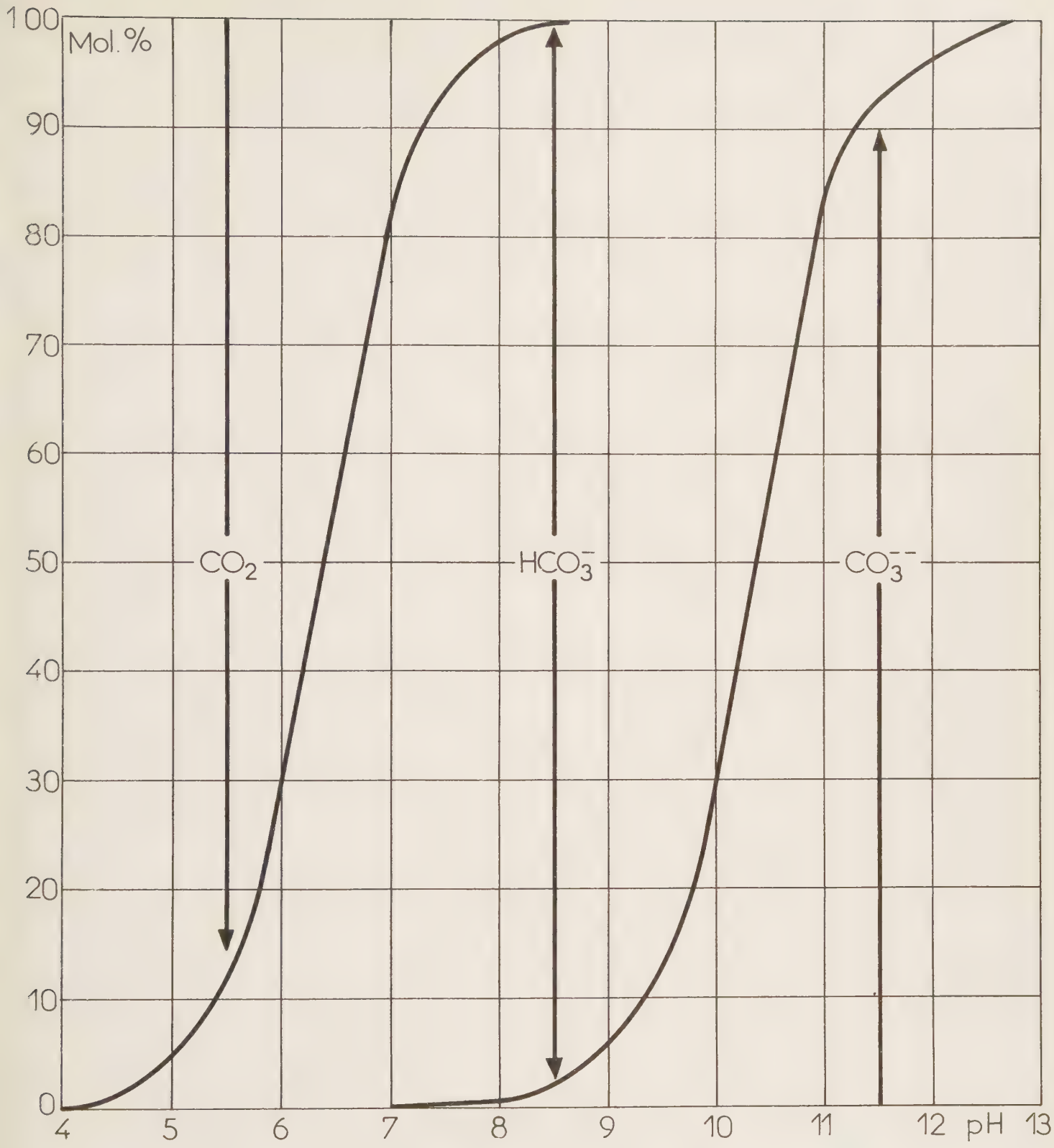


Fig. 5 - Répartition, en fonction du pH, des formes carbonées CO_2, HCO_3^- et CO_3^{--}.

T = 20°C - D'après BUCK K. (25)

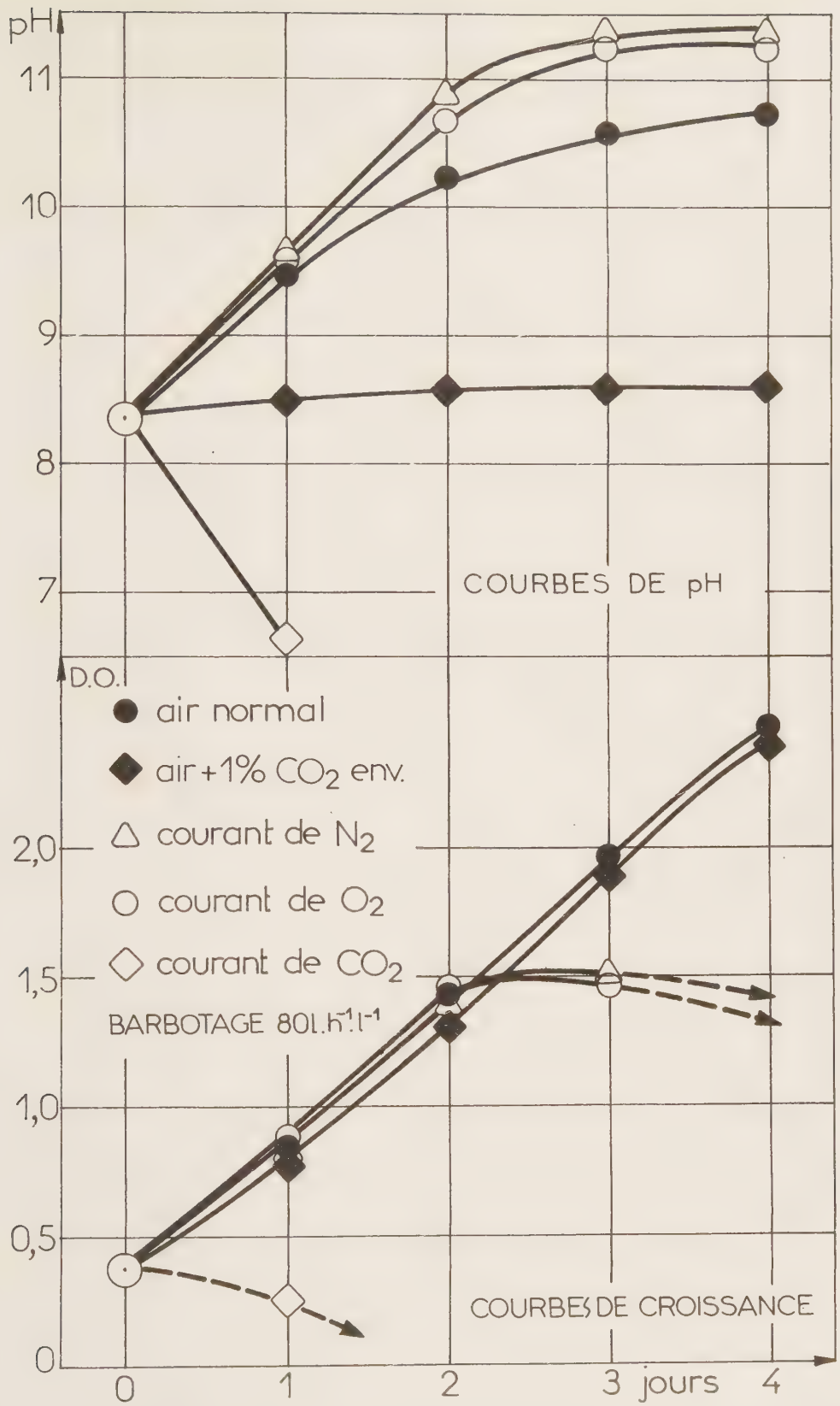


Fig. 6 - Influence de la nature du gaz de barbotage sur la culture de Spirulina

$[NaHCO_3]$ = 0,2 mol.l^{-1} - T = 33°C - 5.000 lux

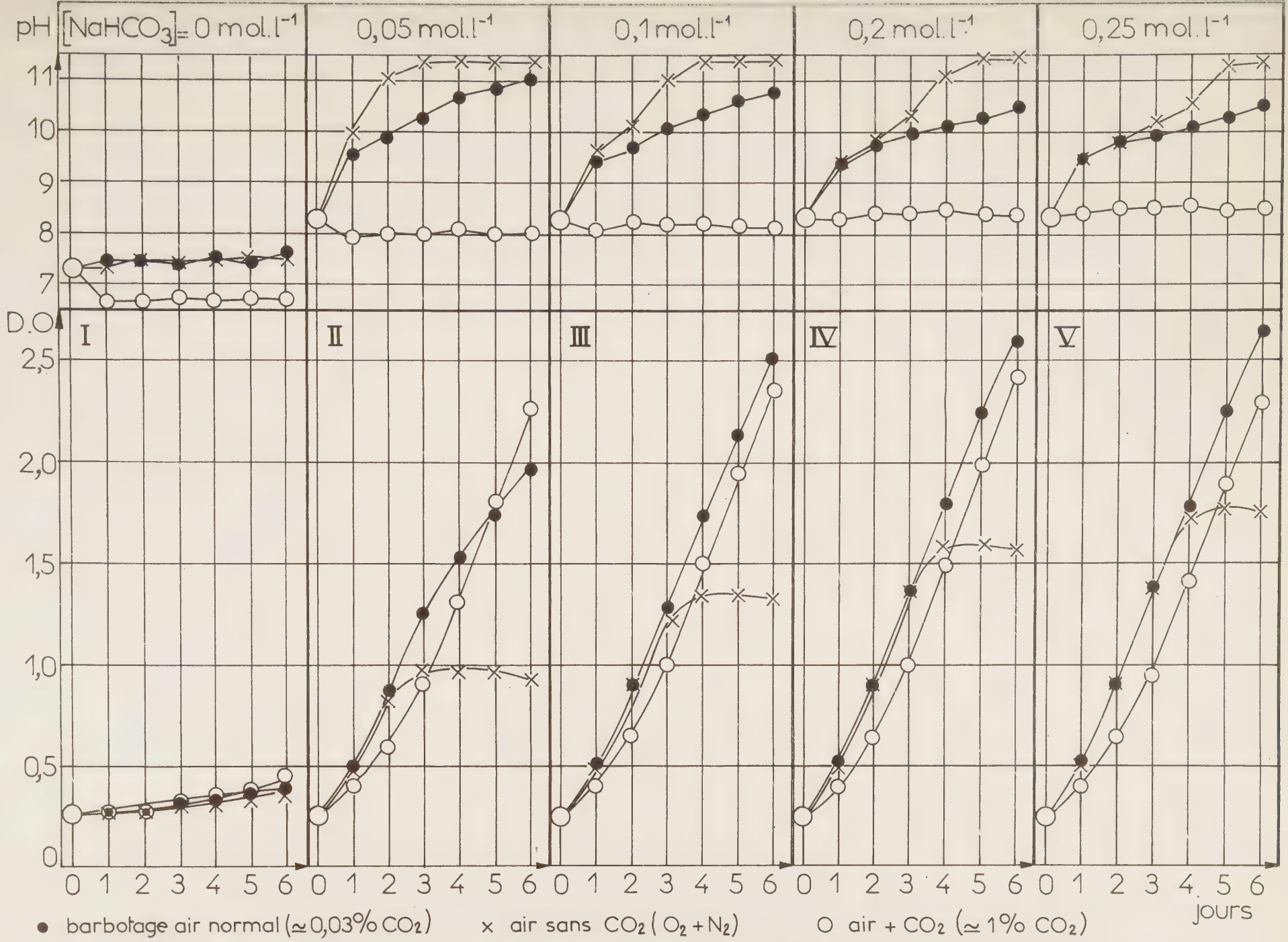
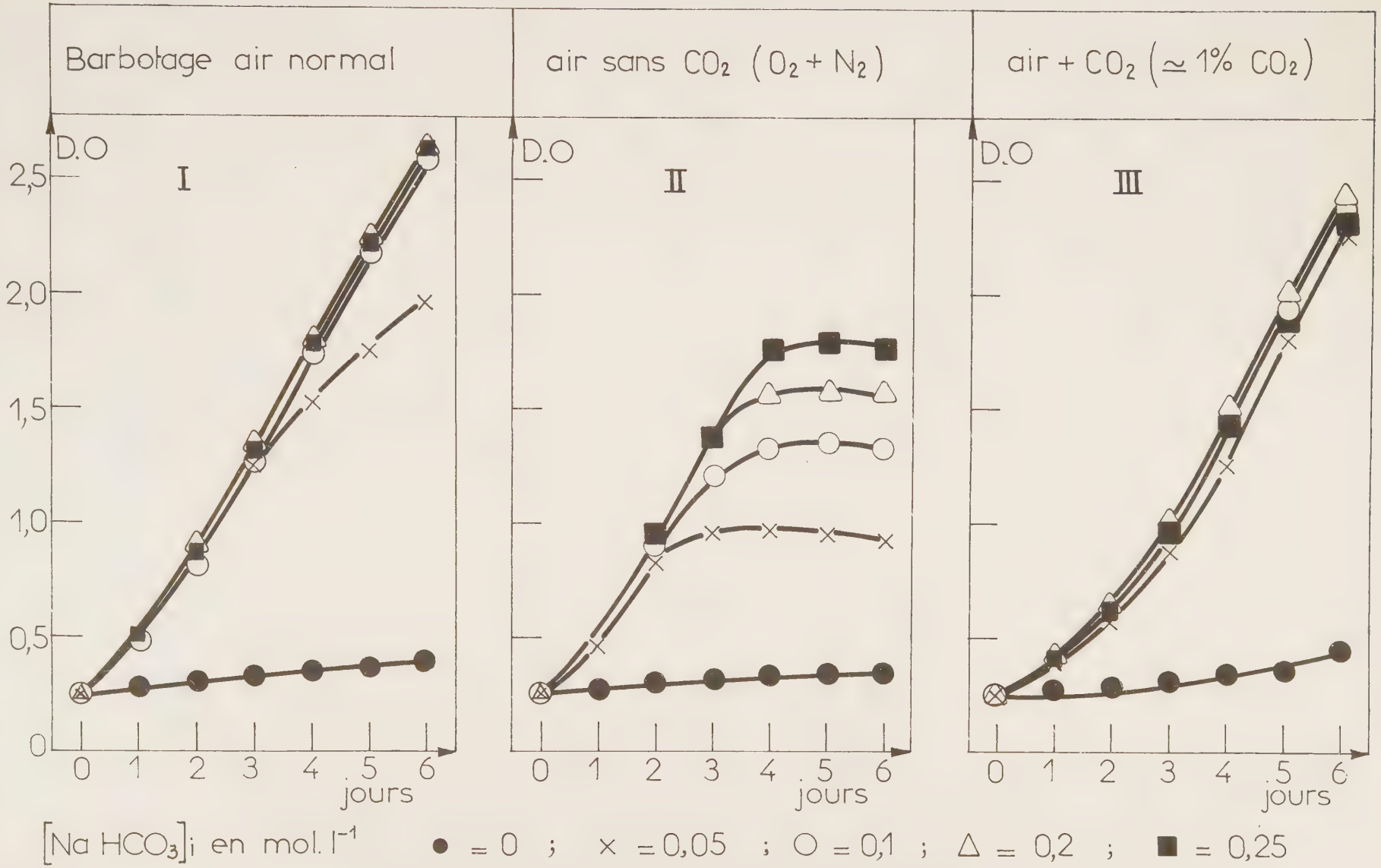


Fig. 7a - Courbes de croissance et de pH pour diverses teneurs en $NaHCO_3$ du milieu

T = 33°C - 5.000 lux - barbotage 80 $l.h^{-1}.l^{-1}$

Fig. 7b - Courbes de croissance de Spirulina en fonction de la $[NaHCO_3]$ et du gaz de barbotage

T = 33°C - 5.000 lux - Barbotage : 80 $l.h^{-1}.l^{-1}$



T = 33°C

Eclairement 5.000 lux

Barbotage 80 $l.h^{-1}.l^{-1}$

$[NaHCO_3]$	● 0,0 $mol.l^{-1}$	○ 0,010 $mol.l^{-1}$
	× 0,001 "	□ 0,025 "
	△ 0,005 "	◇ 0,050 "

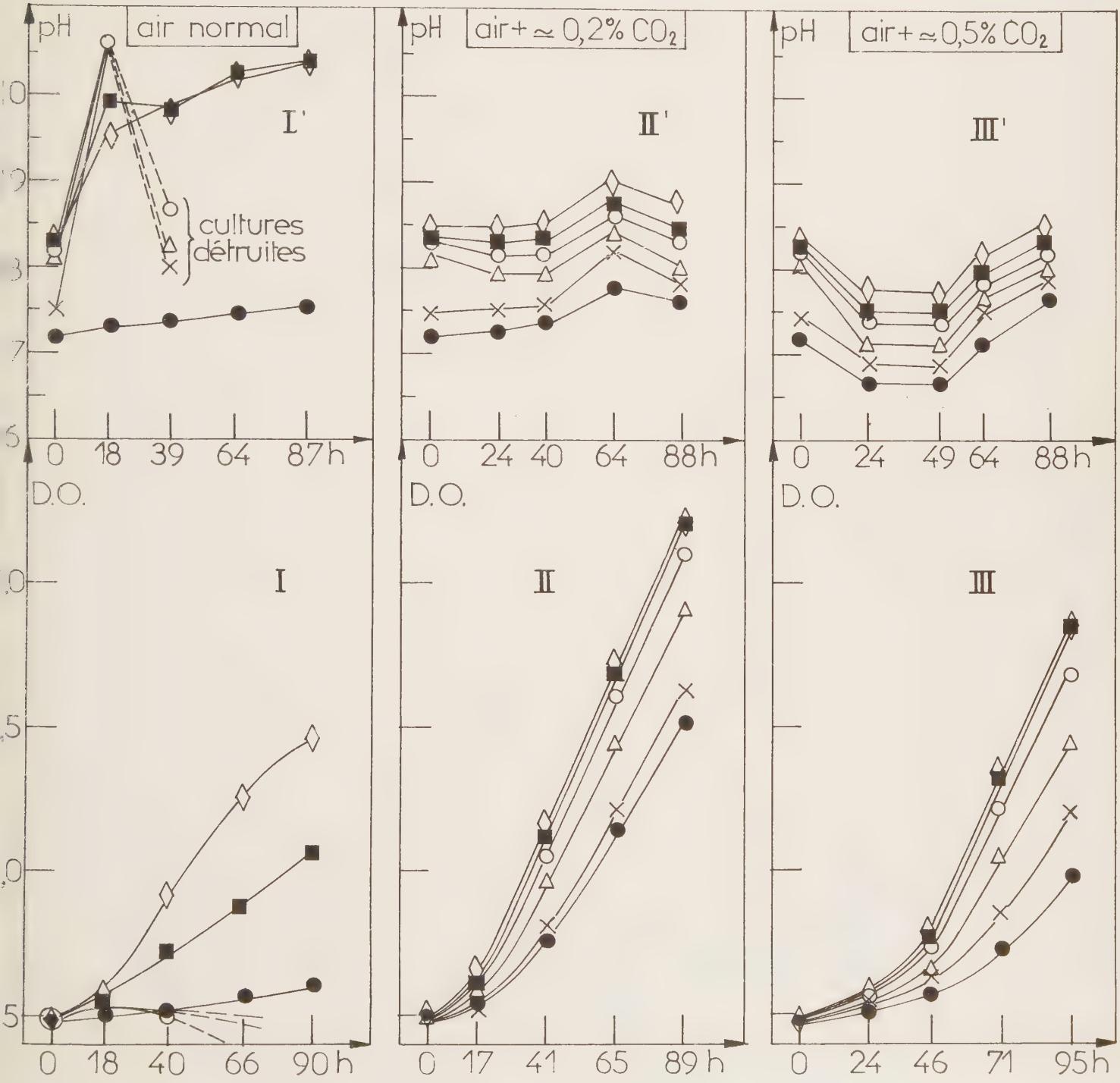


Fig. 8 - Influence de la $[NaHCO_3]$ sur la culture de Spirulina .

Courbes de croissance et de pH

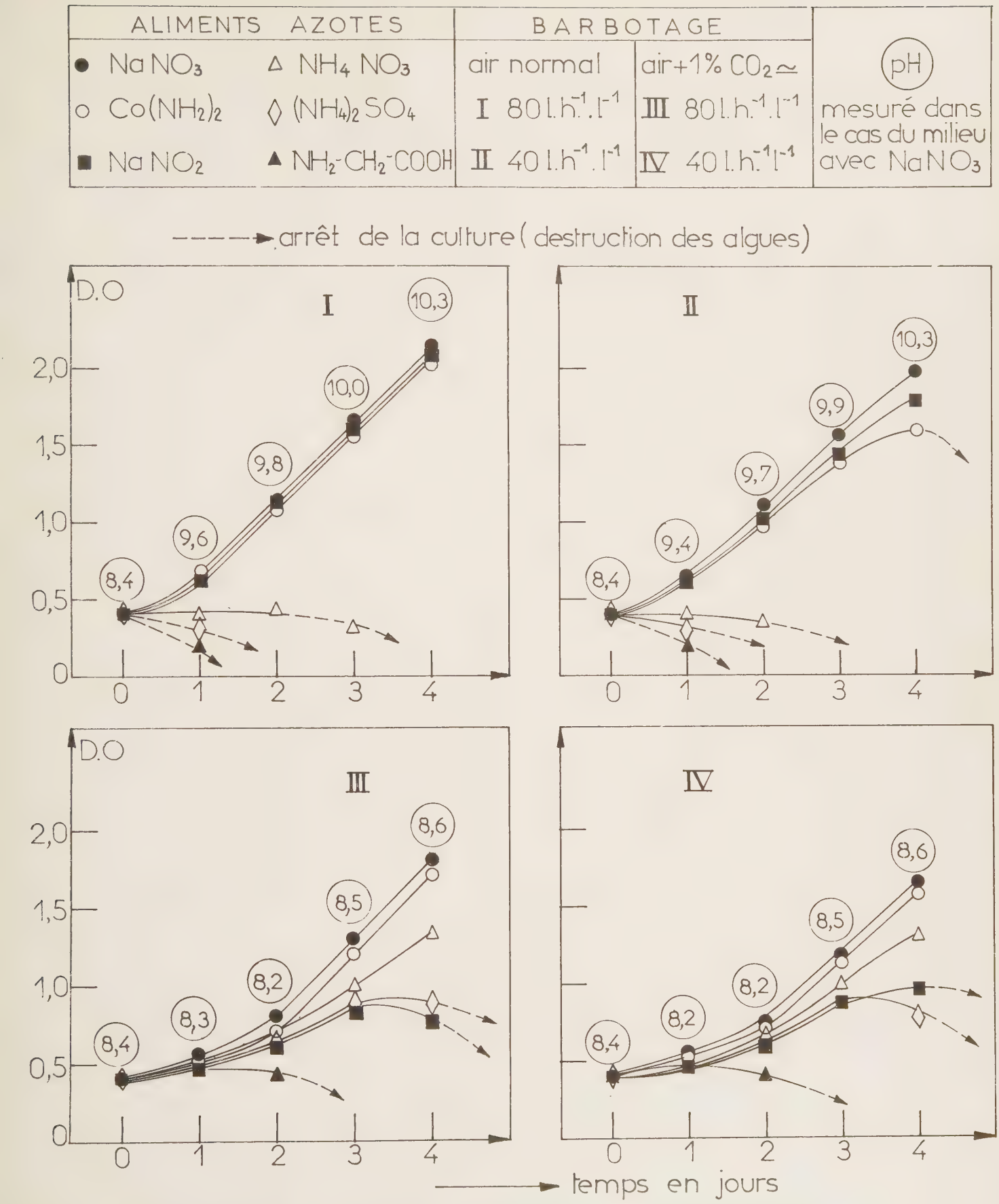


Fig. 9 - Influence de la source d'azote sur la culture de Spirulina

T = 33°C - 5.000 lux - $[N]_i$ = 420 mg.l^{-1}

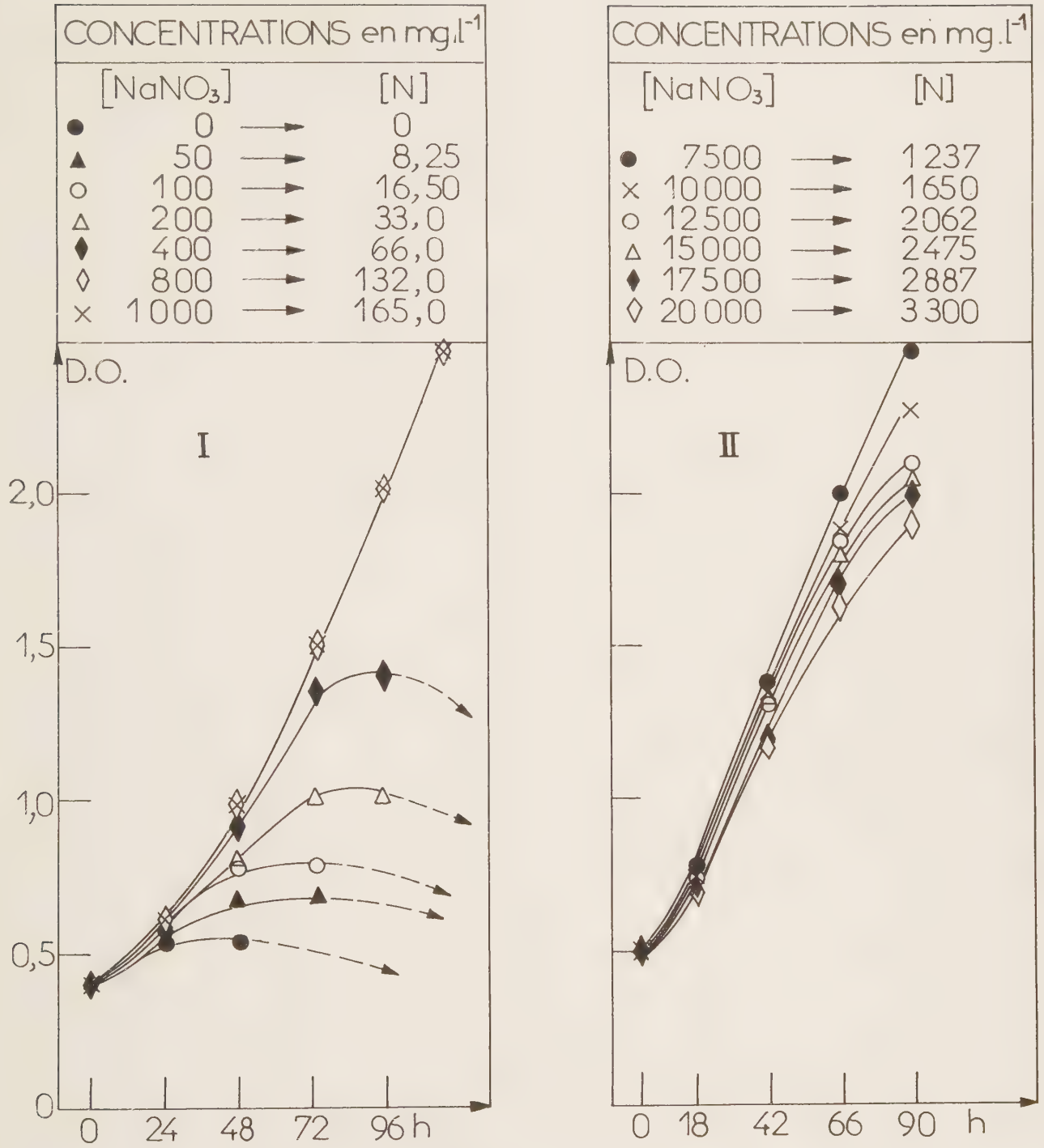


Fig. 10 - Courbes de croissance pour diverses teneurs en azote du milieu

T = 33°C - 5.000 lux

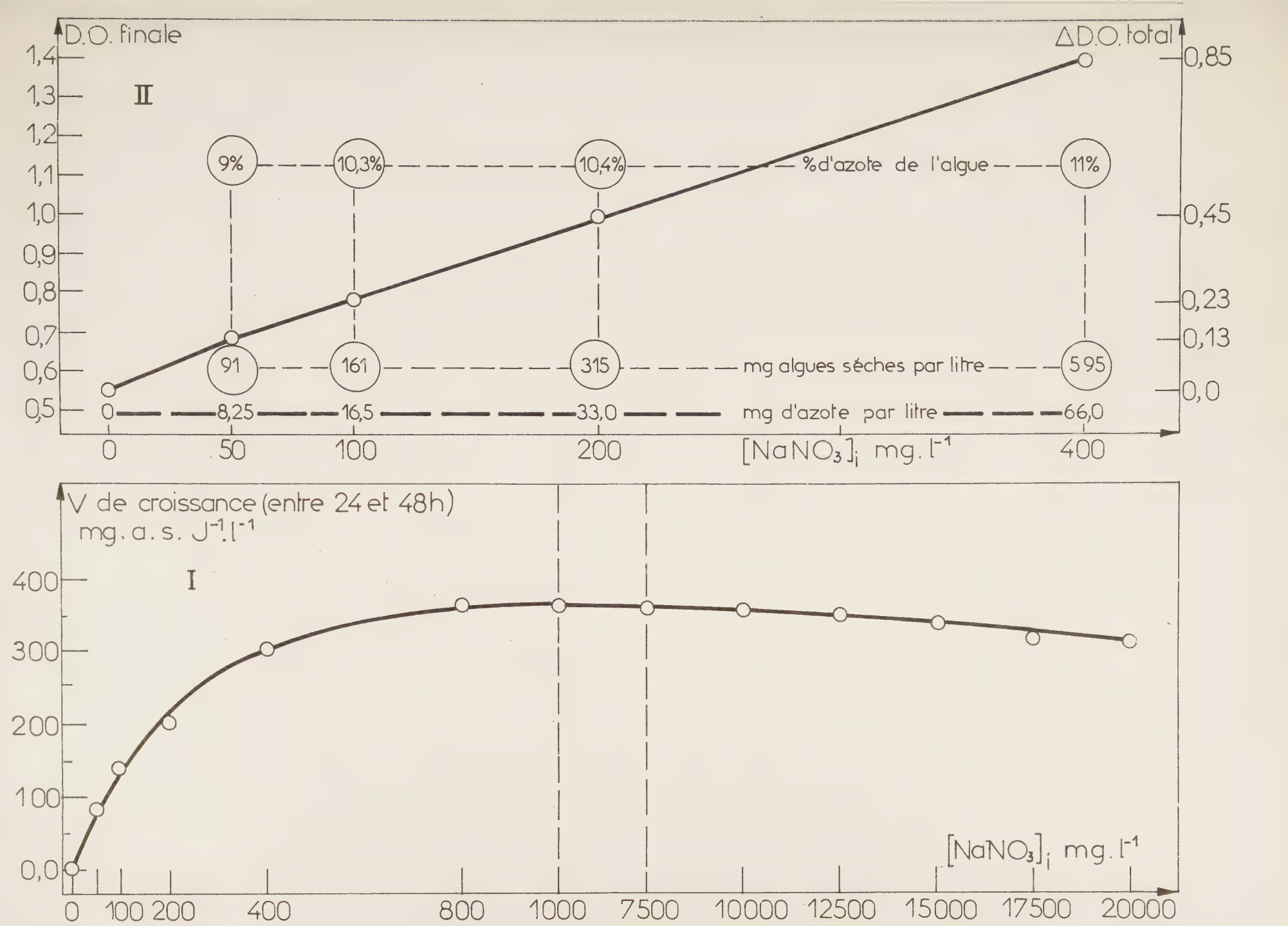
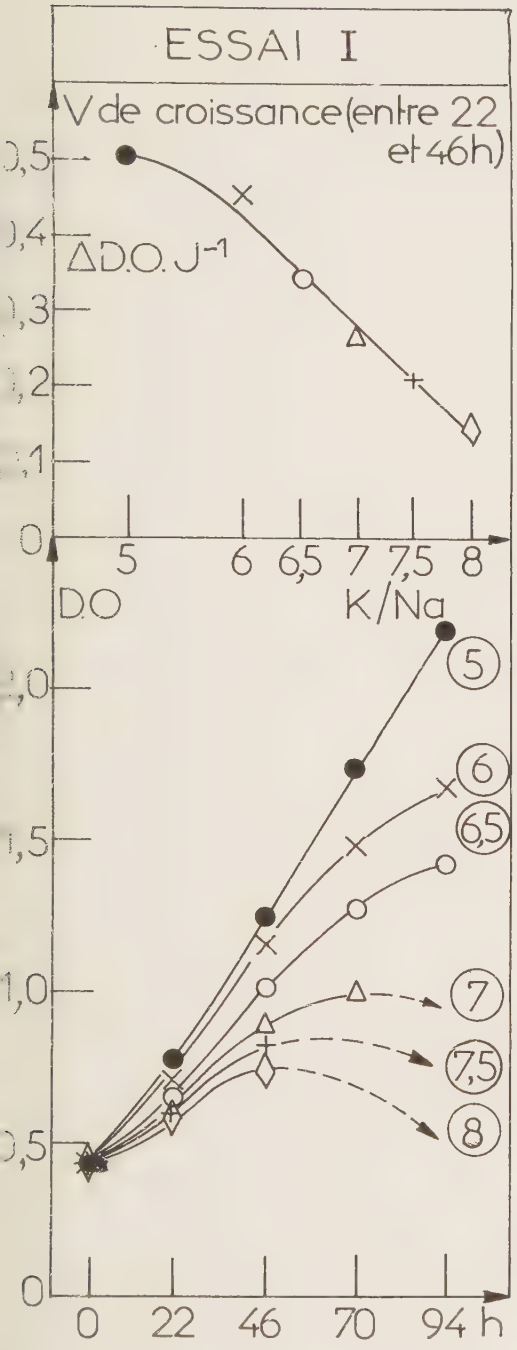
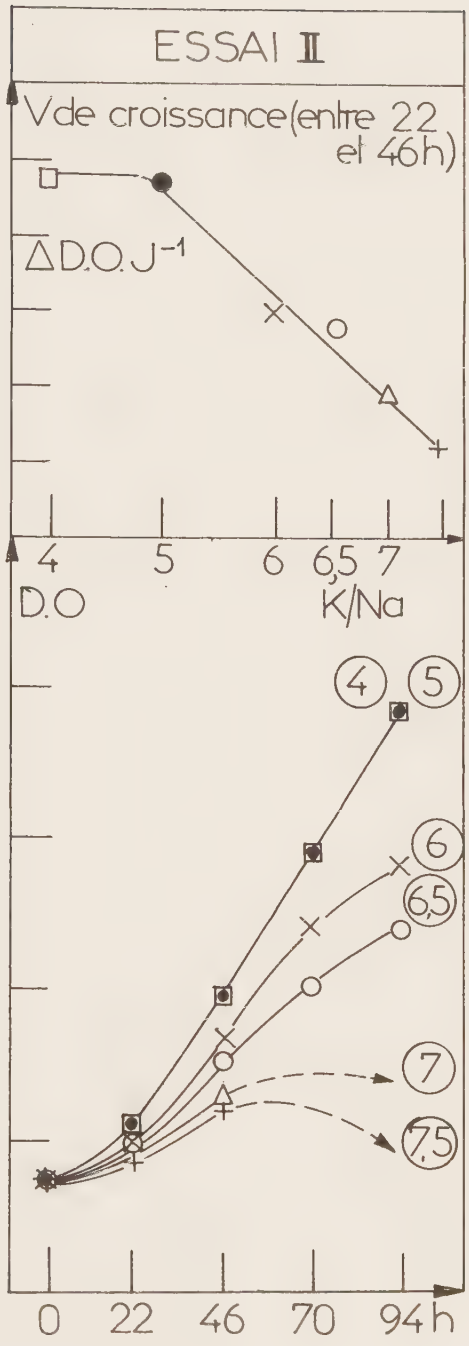


Fig. 11 - Influence de la [N] du milieu sur la vitesse de croissance de Spirulina

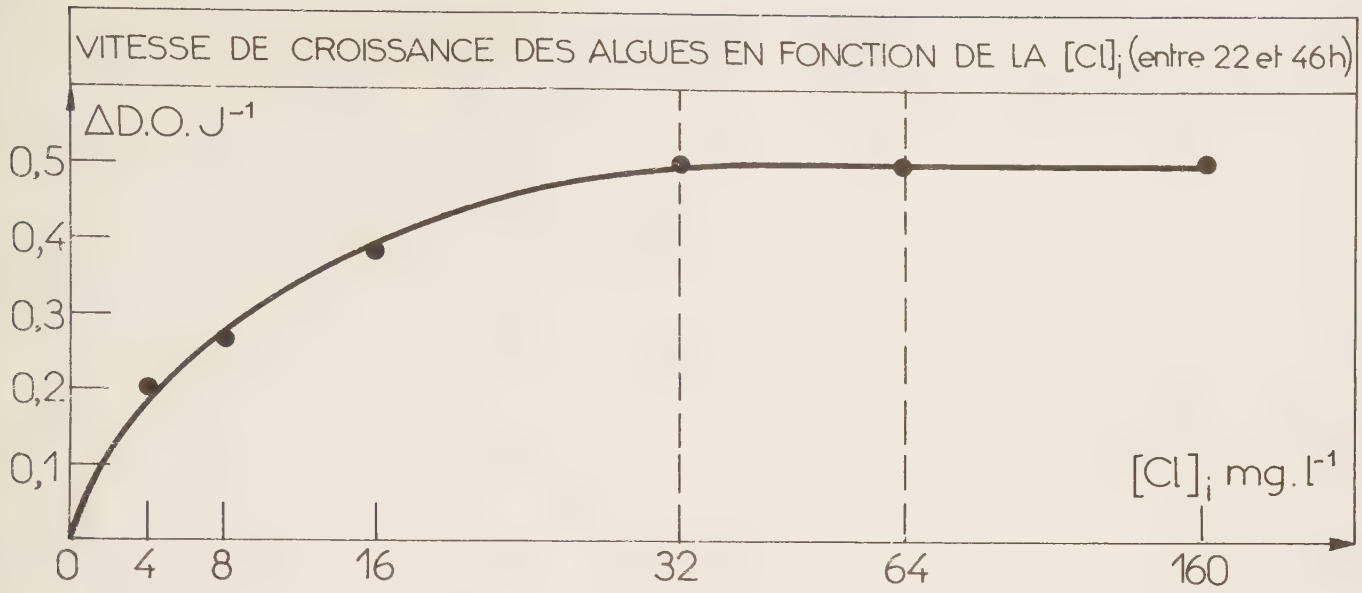




mg.l⁻¹ $\frac{[K]}{[Na]}$	E I	E II	K / Na
□	8136 / 2034	4068 / 1017	4
●	10170 / 2034	5085 / 1017	5
×	12204 / 2034	6102 / 1017	6
○	13221 / 2034	6610 / 1017	6,5
△	14238 / 2034	7119 / 1017	7
+	15255 / 2034	7612 / 1017	7,5
◊	16272 / 2034		8

Fig. 12 - Influence du rapport $\frac{K}{Na}$ sur la vitesse de croissance de Spirulina

T = 33°C - 5.000 lux - barbotage d'air + CO_2 = 80 $l.h^{-1}.l^{-1}$ - pH $\simeq$ 8,3



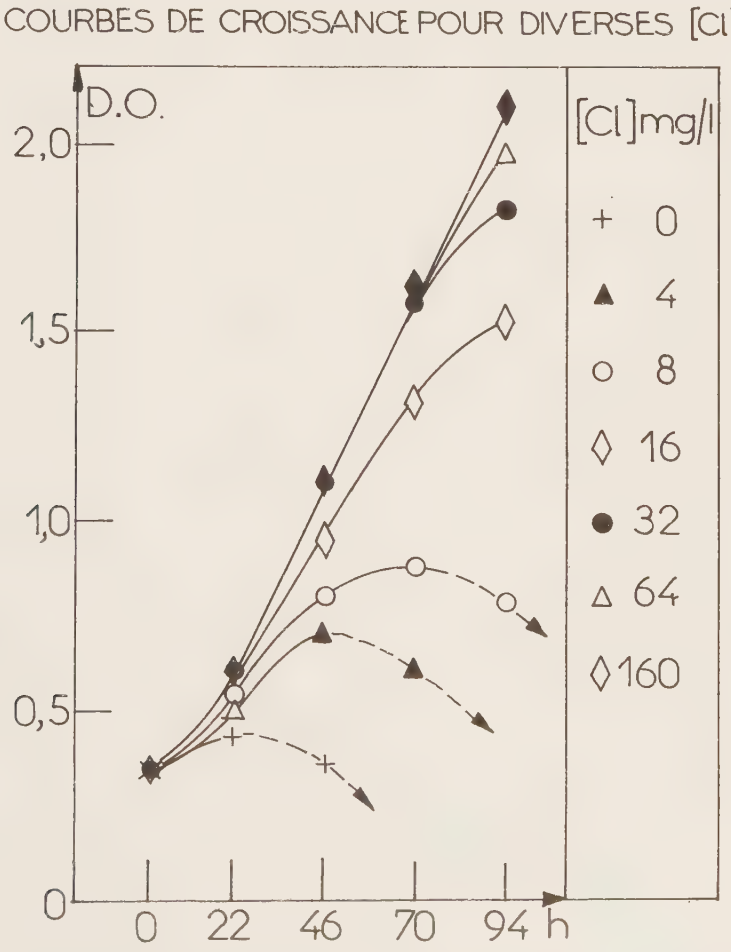


Fig. 13 - Influence de la [Cl] sur la croissance de Spirulina .

T = 33°C - 5.000 lux - pH ≃ 8,8

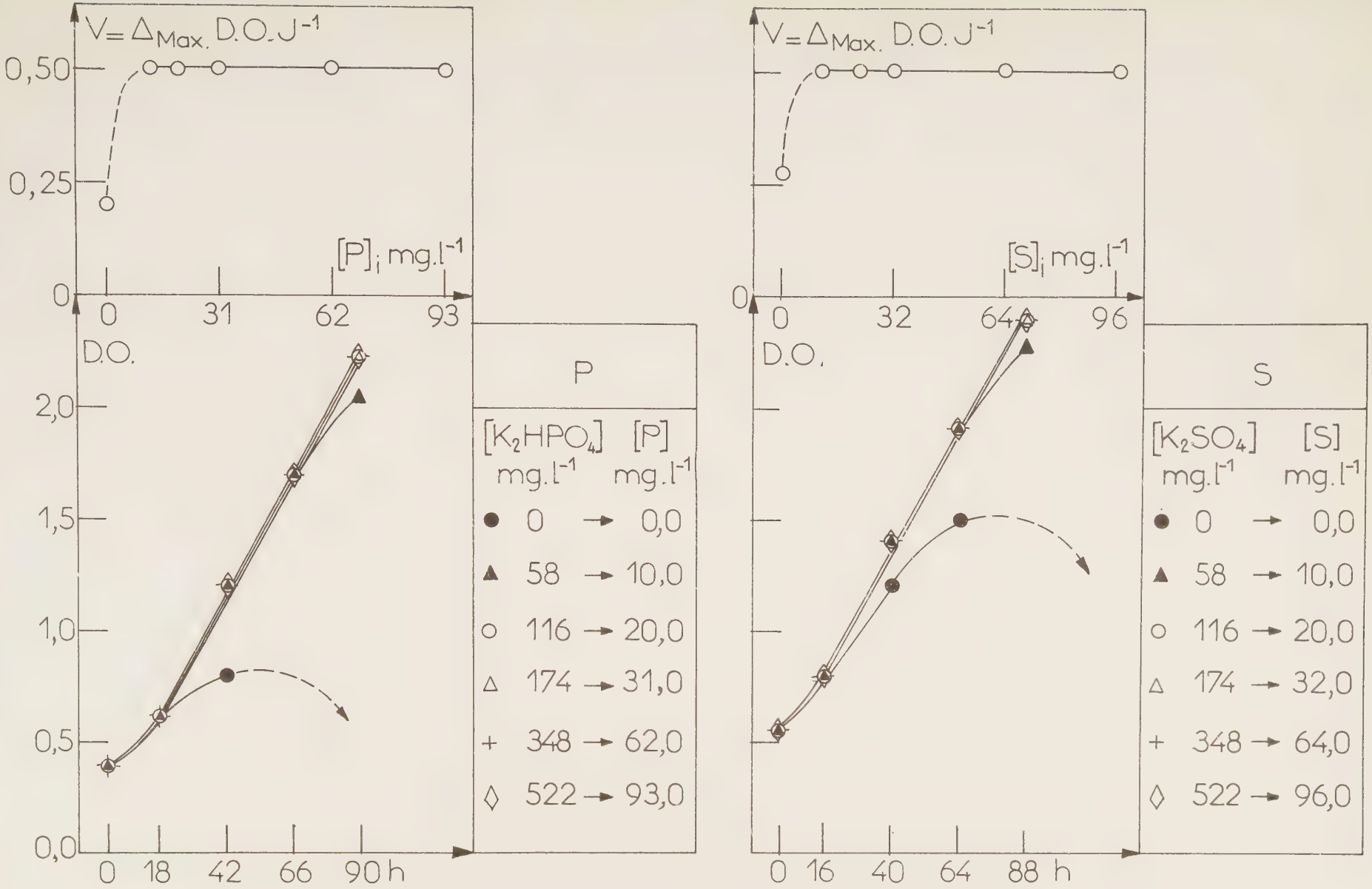


Fig. 14 - Influence de [P] et [S] sur la vitesse de croissance de Spirulina

T = 33°C - 5.000 lux - air + 1 % CO_2 - pH ≃ 8,5

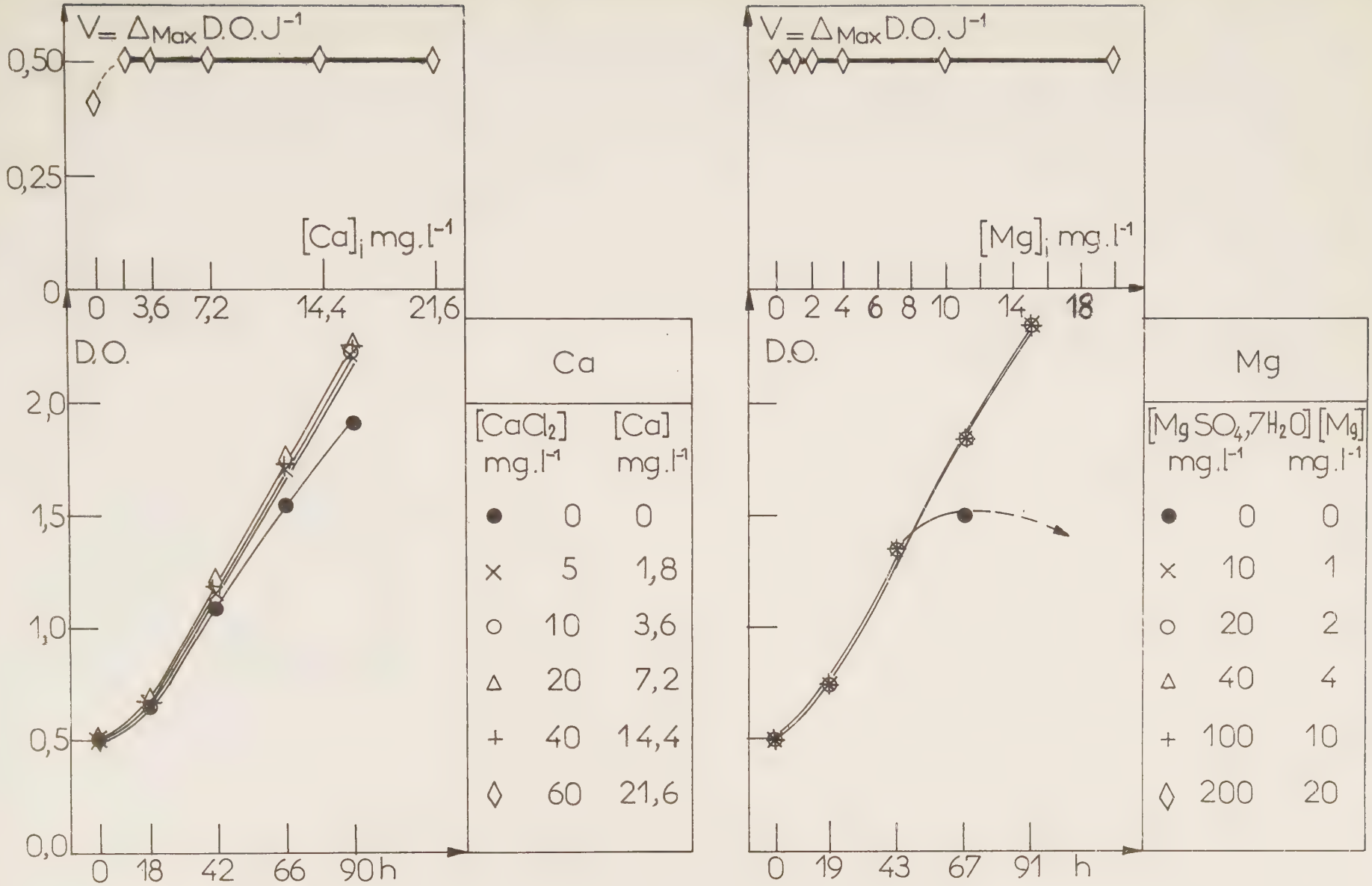
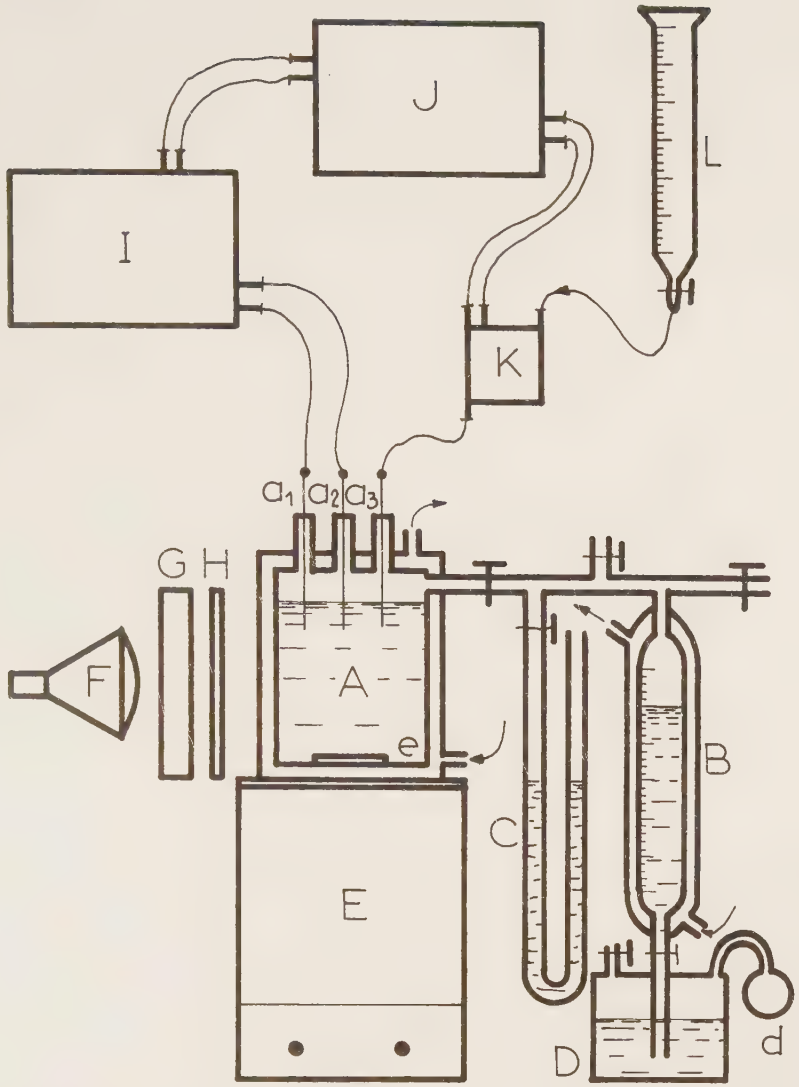


Fig. 15 - Influence de [Ca] et [Mg] sur la vitesse de croissance de Spirulina .

T = 33°C - 5.000 lux - Air + 1 % CO_2 - pH ≃ 8,5



A	Réacteur de photosynthèse
a_1	Introduction électrodes pH-mètre
a_2	Introduction électrodes pH-mètre
a_3	Introduction acide de L
B	Burette calibrée
C	Manomètre
D	Réservoir phtalate de butyle
d	Poire
E	Agitateur magnétique
e	Barreau magnétique
F	Lampe
G	Ecran d'eau
H	Filtre anticalorique
I	pH-mètre
J	Titrimètre automatique
K	Micropompe à galets
L	Burette de Mohr

Fig. 16 - Appareillage pour l'étude de la photosynthèse

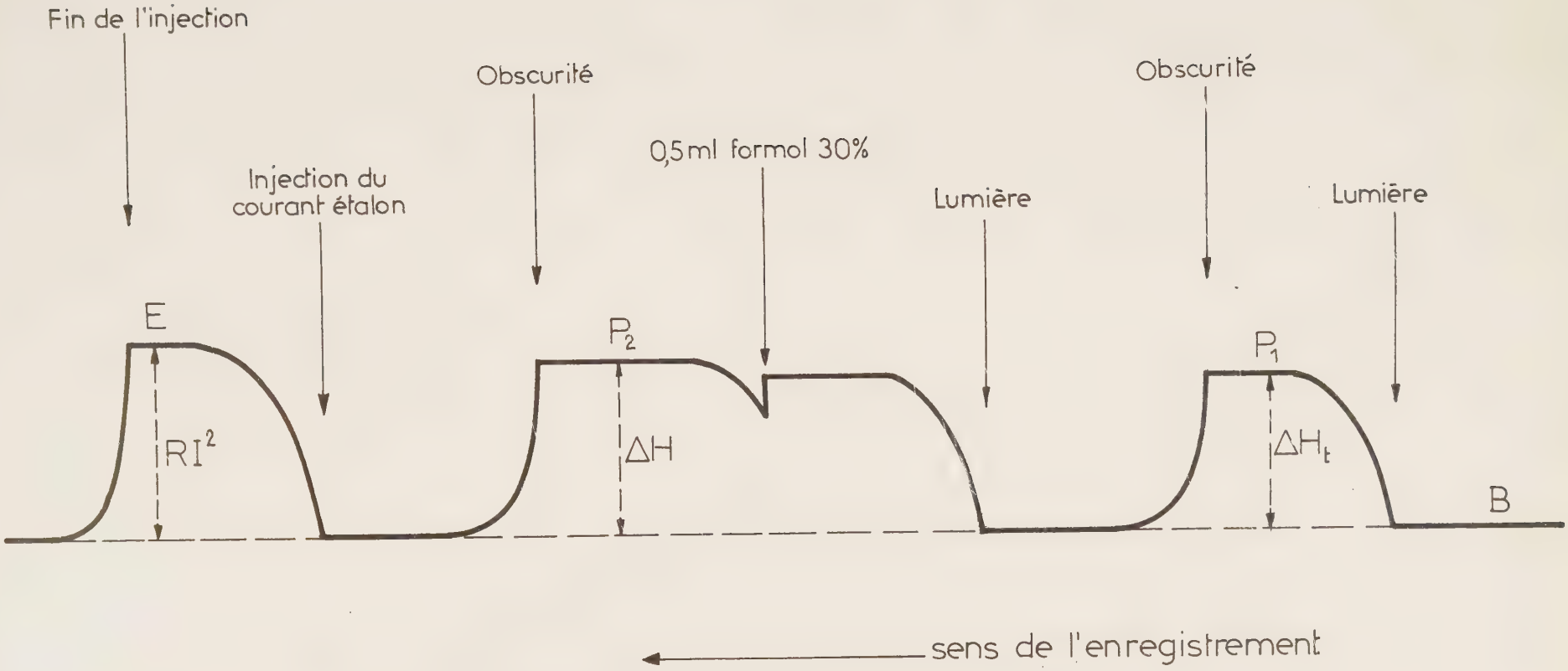


Fig. 17 - Mesure du rendement quantique de la photosynthèse par la méthode thermique différentielle. Schéma d'enregistrement du phénomène

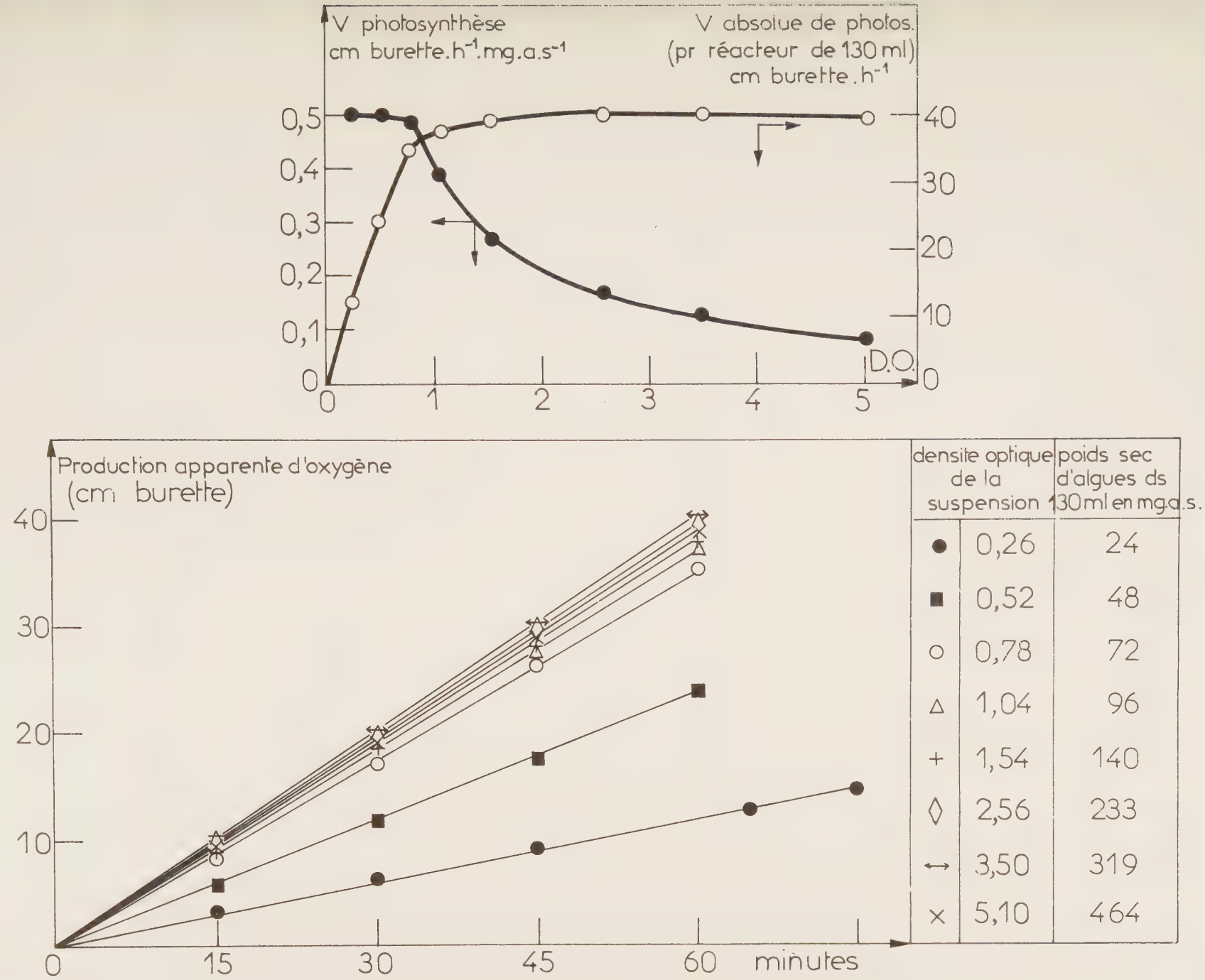


Fig. 18 - Influence de la D.O. de la suspension d'algues sur la photosynthèse de Spirulina.

T = 35°C - Eclairement maximal 60 Klux - 130 ml de suspension - 1 cm burette = $2,54.10^{-5}$ mol.O_2

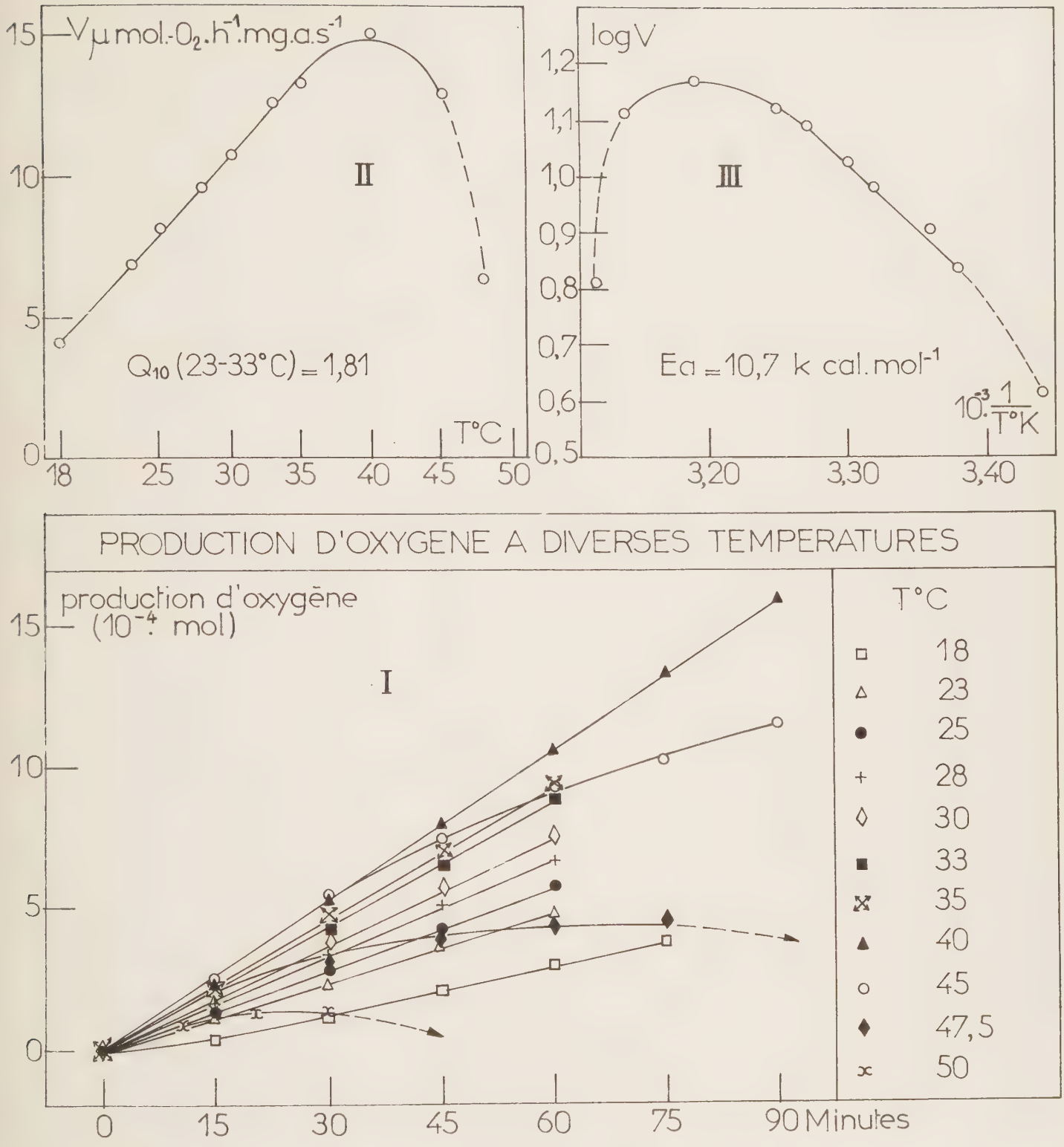


Fig. 19 - Influence de la température sur la vitesse de photosynthèse de Spirulina.

Eclairement maximal 60 Klux - 130 ml de suspension - D.O. = 0,77

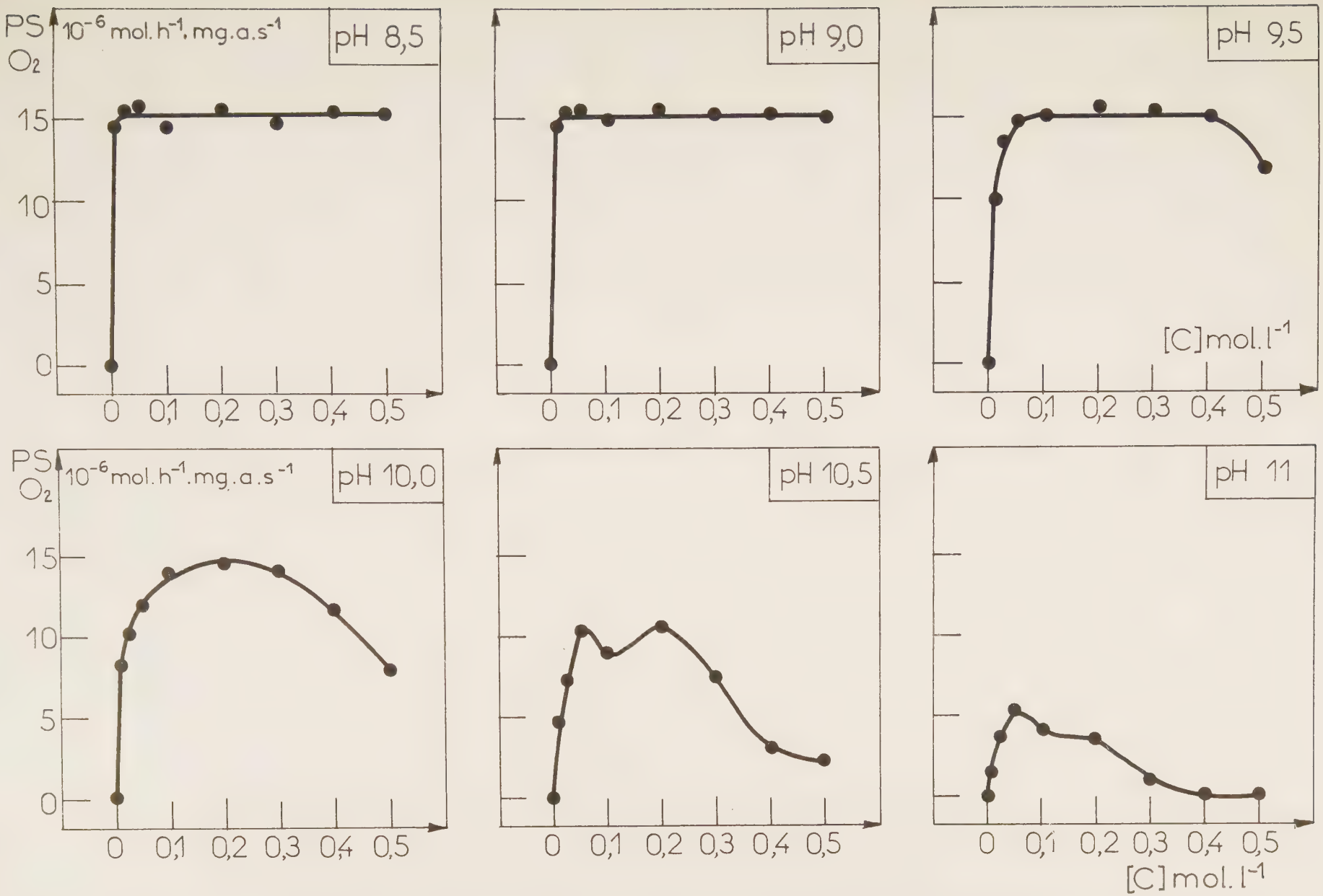


Fig. 20 - Influence de la concentration de la source carbonée sur la vitesse de photosynthèse de Spirulina à différentes valeurs du pH.

Eclairement maximal 60 Klux - T = 40°C - Essais de 60 mn

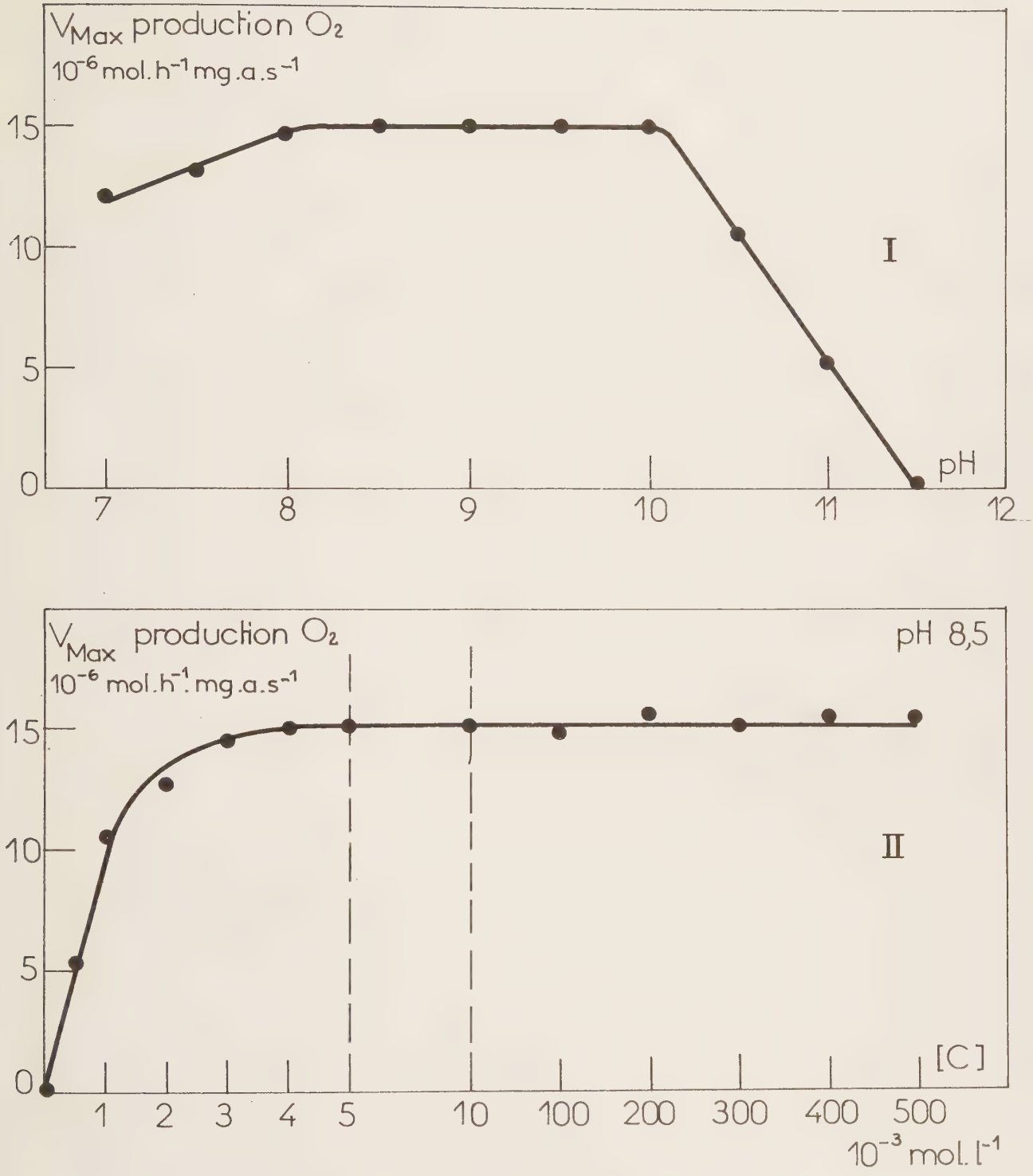


Fig. 21 - Influence du pH et de la concentration de la source carbonée sur la vitesse maximale de photosynthèse chez Spirulina.

Eclairement maximal 60 Klux - T = 40°C

Deuxième thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

LA FUMURE CARBONIQUE ET SES APPLICATIONS RECENTES EN AGRICULTURE

Vu et approuvé :
Paris, le 18 novembre 1966
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE